

Aus dem medizinischen Zentrum für Innere Medizin,  
Schwerpunkt Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechsel

**Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. T. M. Gress**

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Funktionelle Charakterisierung von BCKDK  
im Hinblick auf seine Funktion  
im Pankreaskarzinom**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin  
(Dr. med.)

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Antje Katharina Hülsemann**  
aus Witten

Marburg, 2017

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am 08.12.2017

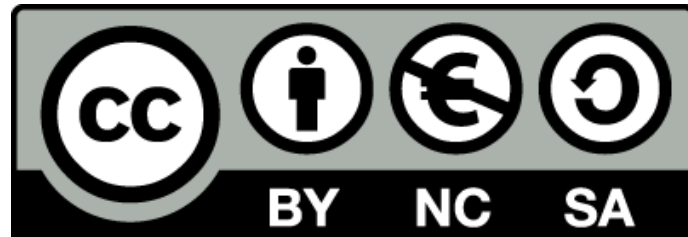
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. Malte Buchholz

1. Korreferent: PD Dr. Brendel

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der  
Philipps-Universität Marburg  
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer  
Creative Commons  
Namensnennung  
Nicht kommerziell  
Weitergabe unter gleichen Bedingungen  
4.0 International Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Das duktales Adenokarzinom des Pankreas.....	1
1.2 Molekularpathologische Grundlagen des PDAC.....	5
1.3 Kinome-wide Screening .....	9
1.4 Die Branched-Chain $\alpha$ -Ketoacid Dehydrogenase-Kinase .....	10
1.5 Zielsetzung der Arbeit .....	14
<b>2. Materialien .....</b>	<b>15</b>
2.1 Verbrauchsmaterialien .....	15
2.2 Chemikalien .....	16
2.3 Laborgeräte .....	17
2.4 Zellkultur .....	19
2.4.1 Nährmedien und Zusätze für die Kultivierung von Zelllinien.....	19
2.4.2 Humane Zelllinien für die <i>in vitro</i> -Experimente .....	19
2.5 Protein-Standard .....	20
2.6 Kits.....	20
2.7 Oligonukleotide .....	20
2.7.1 cDNA-Synthese .....	20
2.7.2 Expressions-Kontrolle von BCKDK.....	20
2.7.3 „Non silencing“-siRNA .....	21
2.7.4 Repression von BCKDK.....	21
2.8 Lösungen für die Polyacrylamid-Gele.....	21
2.8.1 Rezept für die Trenngellösung.....	21
2.8.2 Rezept für die Sammelgellösung .....	22
2.9 Puffer für Western Blot-Analysen .....	22
2.10 Antikörper für Western Blot-Analysen .....	22
2.10.1 Primär-Antikörper.....	22
2.10.2 Sekundär-Antikörper.....	24
<b>3. Methoden.....</b>	<b>25</b>
3.1 Zellbiologische Methoden .....	25
3.1.1 Kultivierung .....	25
3.1.2 Zellzählung .....	25
3.1.3 Transiente Transfektion .....	25

3.1.4 Viabilitätsassay .....	26
3.1.5 Proliferationsassay .....	27
3.1.6 Zellzyklusanalysen.....	28
3.2 Molekularbiologische Methoden .....	29
3.2.1 RNA-Isolation.....	29
3.2.2 cDNA-Synthese .....	29
3.2.3 Quantitative RealTime-PCR .....	30
3.3 Immunologische Methoden (Western Blot-Analysen) .....	32
3.3.1 Vorbereitung der Lysate.....	32
3.3.2 SDS-Gelelektrophorese.....	33
3.3.3 Transfer von Proteinen.....	34
3.3.4 Immunoblotting.....	35
3.4 Statistische Auswertung.....	36
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>37</b>
4.1 Expression von BCKDK im Pankreasgewebe.....	37
4.2 Repression der BCKDK-Expression .....	38
4.2.1 Repressionseffizienz auf mRNA-Ebene .....	38
4.2.2 Repressionseffizienz auf Protein-Ebene .....	39
4.3 Funktionelle Assays.....	40
4.3.1 MTT-Assay .....	40
4.3.2 BrdU-Assay.....	41
4.3.3 Western Blot-Analysen .....	42
4.4 Mechanistische Untersuchungen .....	44
4.4.1 Durchflusszytometrie .....	44
4.4.2 Protoonkogen C-myc und Tumorsuppressor Retinoblastomprotein.....	46
4.4.3 CDK-Inhibitoren .....	46
4.4.4 Cycline .....	48
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>49</b>
5.1 Das Branched-Chain $\alpha$ -Ketoacid Dehydrogenase-Kinase-Gen.....	49
5.2 Proteinregulation.....	50
5.3 Funktionen der Branched-Chain $\alpha$ -Ketoacid Dehydrogenase-Kinase.....	51
5.4 Off-Target-Effekte .....	52
5.5 Die mRNA der Branched-Chain $\alpha$ -Ketoacid Dehydrogenase-Kinase.....	55
5.6 Weitere Einflussfaktoren .....	57

5.7 Schlussfolgerung und Ausblick .....	57
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>59</b>
<b>Summary .....</b>	<b>60</b>
<b>7. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>62</b>
<b>8. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>66</b>
<b>9. Anhang.....</b>	<b>80</b>
9.1 Weitere Abbildungen.....	80
9.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer .....	83
9.3 Danksagung .....	84

## 1. Einleitung

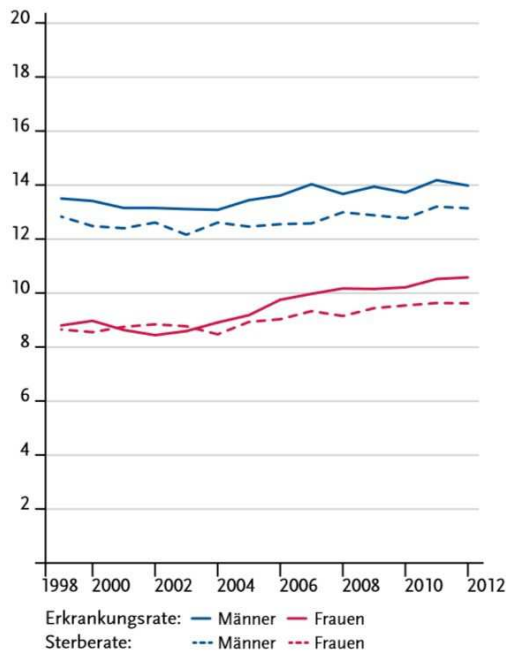
Die Bauchspeicheldrüse (Pankreas) besteht aus endokrinem sowie exokrinem Gewebe. In den Langerhans-Inseln des endokrinen Anteils werden Stoffwechselhormone wie Insulin, Glukagon oder Somatostatin gebildet und direkt an das Blut abgegeben. Der exokrine Anteil hingegen besteht aus Azini, deren Zellen die Verdauungsenzyme bilden. In der digestiven Phase werden diese in den Ausführungsgängen des Pankreas mit Bikarbonat vermischt und in das Duodenum geleitet, wo sie ihre Wirkung entfalten (Falke et al. 2008). Unter dem Einfluss von endogenen und exogenen Faktoren kann es zur Entartung des pankreatischen Gewebes kommen. Diese bösartigen Neubildungen der Bauchspeicheldrüse werden je nach Ursprungsort in endokrine und exokrine Tumoren unterteilt. 95% der Pankreastumoren entstehen aus dem exokrinen Anteil des Organs, wobei in der Mehrzahl der Fälle wahrscheinlich eine Transformation der Azinuszellen in epitheliale Zellen vonstattengeht (Hackeng et al. 2016). Ein Großteil der Fälle ist dementsprechend der Entität des duktaalen Adenokarzinoms des Pankreas (PDAC, im Folgenden als Pankreaskarzinom bezeichnet) zuzuordnen.

Die Versuche im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurden mit Zelllinien durchgeführt, die entweder aus einem Primärtumor oder einer Metastase eines humanen PDAC generiert worden sind.

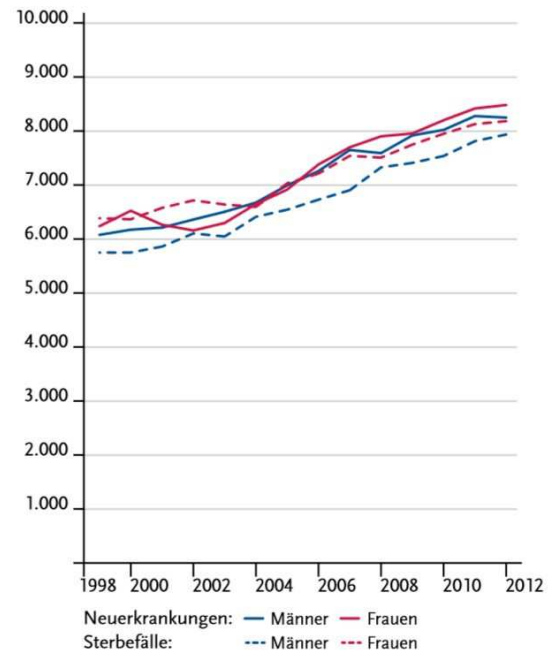
### 1.1 Das duktaale Adenokarzinom des Pankreas

Jeder Deutsche hat im Schnitt ein 1,7-prozentiges Risiko in seinem Leben an einem Pankreaskarzinom zu erkranken, wobei das durchschnittliche Alter bei Erstdiagnose 73 Jahre beträgt (RKI und Krebsregister in Deutschland, 2015).

Die altersstandardisierte Inzidenz der Erkrankungen ist seit 1998 konstant bei etwa 12 pro 100.000 Einwohner geblieben (Abb.1). Aufgrund einer immer älter werdenden Bevölkerung nehmen die absoluten Erkrankungszahlen jedoch zu (Abb.2) (RKI und Krebsregister in Deutschland, 2015). Ebenfalls konstant geblieben sind die Sterberaten der am Pankreaskarzinom erkrankten Personen (altersstandardisierter Wert: ~11 pro 100.000 Einwohner in 2012) (RKI und Krebsregister in Deutschland, 2015).



**Abbildung 1: Altersstandardisierte Erkrankungs- und Sterberaten des Pankreaskarzinoms in Deutschland (1999-2012) je 100.000.**



**Abbildung 2: Absolute Zahl der Neuerkrankungen- und Sterbefälle des Pankreaskarzinoms in Deutschland (1999-2012).**

Abbildung entnommen aus „Robert-Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2015): Krebs in Deutschland 2011/2012“.

Diese Beobachtung zeigt, dass das Therapieansprechen sich in den vergangenen Jahren trotz intensiver Forschung und besserem Verständnis für die Pathogenese des Karzinoms kaum verbessert hat. Das Pankreaskarzinom hat weiterhin eine hohe Mortalität: der Bauchspeicheldrüsenkrebs lag 2012 bei der Häufigkeit aller Tumoren bei Männern in Deutschland zwar nur auf Platz 10, nahm bei den durch Krebserkrankungen verursachten Todesfällen jedoch bereits Platz vier ein (RKI und Krebsregister in Deutschland, 2015).

Trotz intensiver Forschung ist die Ätiologie des dukalen Adenokarzinoms immer noch weitestgehend ungeklärt. Als Risikofaktoren konnten vor allem Lebensstilfaktoren (Alkoholkonsum, Nikotinabusus, Adipositas) identifiziert werden (Oettle et al. 2010). Zudem erhöhen chronische Erkrankungen des Pankreas das Risiko für eine bösartige Entartung (chronische Pankreatitis, gutartige oder zystische Pankreastumoren) (S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom 2013). Genetische Faktoren werden aktuell diskutiert, in etwa 10% der Karzinomfälle spielen familiäre Komponenten eine Rolle (Petersen et al. 2006). Hierbei gilt als gesichert, dass



Menschen ein erhöhtes Risiko haben, bei denen zwei oder mehr Verwandte ersten Grad erkrankt sind (S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom 2013).

Das PDAC wird mithilfe der TNM-Klassifikation in AJCC-Stadien eingeteilt (Tab. 1, Oettle et al. 2010).

Tabelle 1: Einteilung des Pankreaskarzinoms.

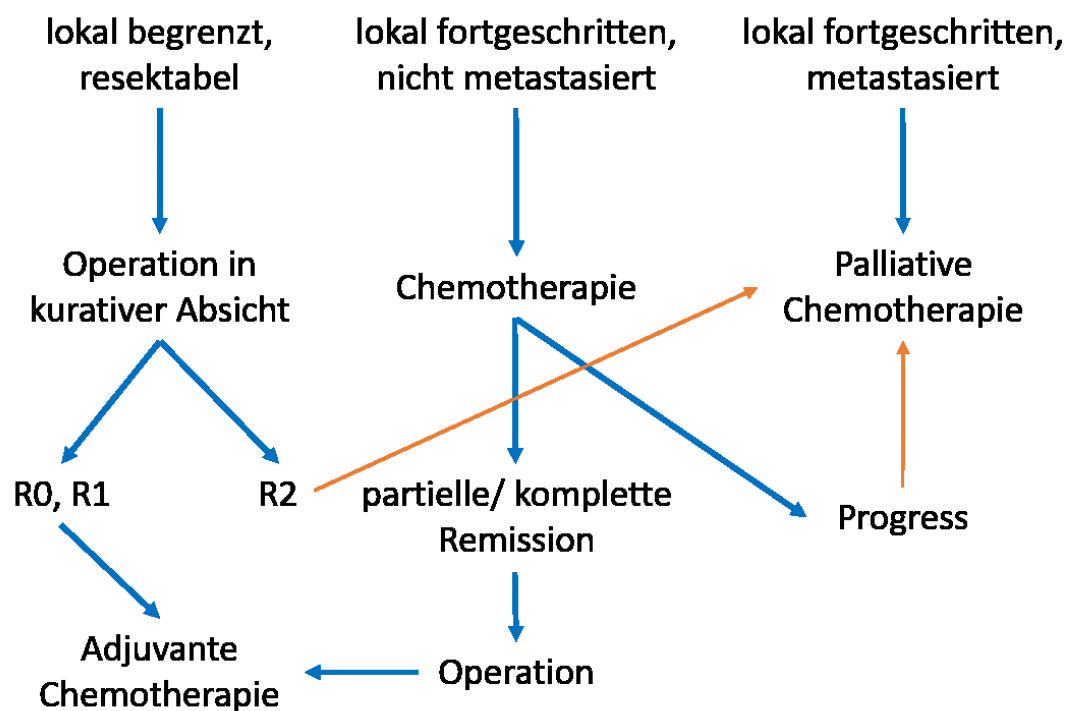
AJCC-Stadium	Primärtumor	Lymphknotenstatus	Fernmetastasen	Beschreibung
0	Tis	N0	M0	Carcinoma in situ
IA	T1	N0	M0	<2cm
IB	T2	N0	M0	>2cm
IIA	T3	N0	M0	Wachstum über die Organgrenze
IIB	T1-T3	N1	M0	Befall regionale Lymphknoten
III	T4	alle N	M0	Infiltration großer Nerven/ Gefäße
IV	alle T	alle N	M1	Fernmetastasierung

Quelle: Oettle et al. 2010.

Eine der größten Hürden in der Behandlung des PDAC ist die in der Regel späte Diagnosestellung. In den frühen Stadien des PDAC zeigen sich klinisch oft keine oder unspezifische Symptome, wie etwa Rücken- oder Bauchschmerzen. In späteren Stadien kommt es dann gehäuft zur B-Symptomatik in Form von Fieber, ungewolltem Gewichtsverlust oder Nachtschweiß (Oettle et al. 2010). Aufgrund der soliden Konsistenz des Tumors sowie seiner bevorzugten Lokalisation im Pankreaskopf (zwei Drittel aller PDAC) kann es zu einer Stenose des Ductus choledochus sowie des Ductus pancreaticus kommen, die im Pankreaskopf zusammenfließen. Der nachfolgende Gallenstau kann sowohl sonographisch als auch im MRT (Double-Duct-Zeichen) gesehen werden. Die Stenose kann neben Verdauungsproblemen zu einer Begleitpankreatitis durch Rückstau des Pankreassekrets sowie einem schmerzlosen Ikterus durch Rückstau der Galle führen (Courvoisier-Zeichen) (Oettle et al. 2010). Diese unspezifischen Hinweise auf eine Entartung des Pankreasgewebes sowie die für die bildgebende Diagnostik nur schwer erreichbare retroperitoneale Lage des Pankreas führen dazu, dass der Tumor häufig erst in fortgeschrittenem Stadium erkannt wird. Als Tumormarker kann das CA-19-9 dienen (Nazli et al. 2000). Dieses ist zwar pankreas-, jedoch nicht karzinomspezifisch und kann auch bei anderen pankreatischen Erkrankungen, wie einer Pankreatitis, erhöht

sein. Genutzt wird das CA-19-9 deshalb vor allem zur postoperativen Verlaufskontrolle.

Das Vorgehen in der Therapie des Pankreaskarzinoms ist in Abbildung 3 dargestellt. Die einzige kurative Therapieoption ist aktuell die operative Entfernung des Tumors nach Kausch-Whipple (R0-Resektion mit Lymphadenektomie) (S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom 2013). Trotz radikaler Operation gelingt nur bei 15-20% der Patienten eine R0-Resektion, da der Tumor bei Erstdiagnose häufig bereits angrenzende Blutgefäße ummauert oder das umgebende Gewebe infiltriert hat (AJCC Stadium III, Oettle et al. 2010). Zudem kommt es schon sehr früh zu einer lymphogenen oder hämatogenen Metastasierung. Als palliative Maßnahmen bei Inoperabilität kommen eine systemische Chemotherapie mit Gemcitabin sowie Kombinationstherapien in Frage (Von Hoff et al. 2013). Zudem können symptomorientierte Maßnahmen ergriffen werden, z.B. eine Wiedereröffnung des Gallengangs mittels Stent (S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom 2013).



**Abbildung 3: Therapievorgehen bei Diagnosestellung eines Pankreaskarzinoms.**

*Quelle: Oettle et al. 2010.*

Die Prognose des Pankreaskarzinoms ist schlecht. Fünf Jahre nach Diagnosestellung leben nur noch rund 8% der Patienten (RKI und Krebsregister in Deutschland, 2015). Ist eine R0-Resektion des Tumors möglich, steigt die 5-Jahresüberlebensrate

lediglich auf 20% (Beger et al. 2008). Damit hat das Pankreaskarzinom die niedrigste Überlebensrate aller Krebserkrankungen.

## 1.2 Molekularpathologische Grundlagen des PDAC

Trotz intensiver Forschung auf dem Gebiet des Pankreaskarzinoms sind die zugrundeliegenden Pathomechanismen noch nicht vollständig verstanden. Ergebnisse verschiedener Studien unterstützen die Vorstellung eines Tumorprogressionsmodells, in dem das invasive Karzinom aus Vorläuferläsionen, sogenannte PanIN, entsteht (Zhang et al. 2007). Es wird angenommen, dass hierfür eine Akkumulation verschiedener Genmutationen verantwortlich ist.

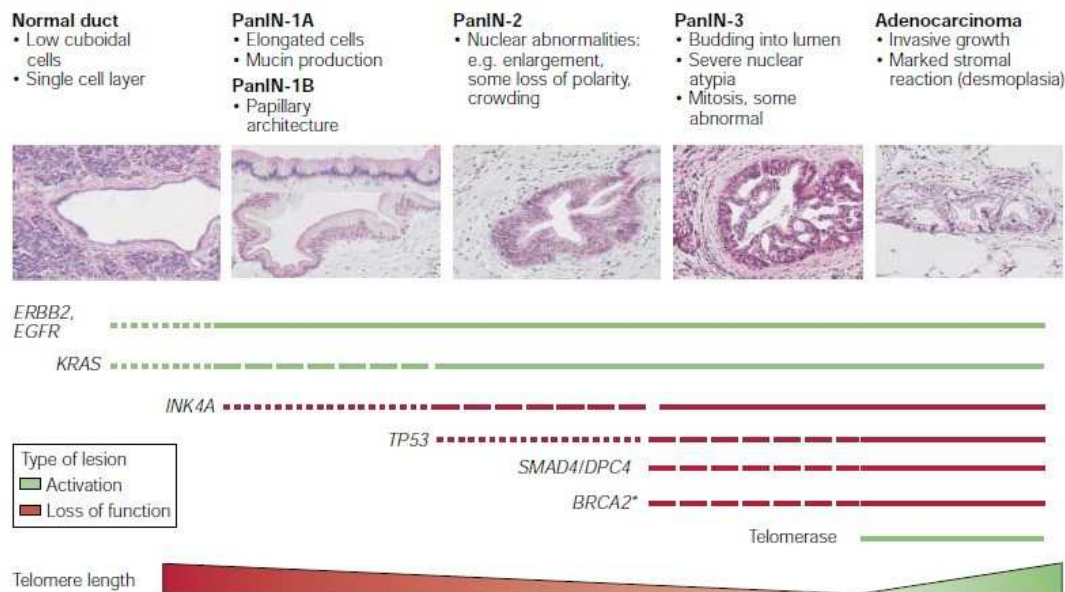
Diese präneoplastischen Gangläsionen werden in verschiedene Stadien unterteilt. Eine muzinöse Hypertrophie charakterisiert das PanIN-1A-Stadium, wohingegen das PanIN-1B-Stadium eine papilläre Hyperplasie zeigt. Kommt zu dieser eine mäßige Dysplasie mit Kernatypien hinzu, spricht man von PanIN-2. PanIN-3 entspricht einem Carcinoma in situ (Cis), es bestehen schwere Zellatypien wie atypische Mitosen und luminale Nekrosen bei intakter Basalmembran (Hruban et al. 2001).

In Untersuchungen verschiedener pankreatischer Gewebe wurde beobachtet, dass PanIN-1 häufig mit gutartigen Hyperplasien vergesellschaftet sind und auch ohne gleichzeitiges Vorliegen eines PDAC auftreten (Lüttges et al. 1999). PanIN-2 und -3 hingegen finden sich fast ausschließlich in unmittelbarer Nähe eines PDAC (Cubilla et al. 1976). Über die Interpretation der gewonnenen Erkenntnisse wird noch diskutiert. Eine Vermutung lautet, dass die PanIN-2 die eigentliche Vorstufe des Cis (PanIN-3) sowie des daraus entstehenden PDAC darstellen, während den PanIN-1 unabhängige Geschehnisse in unmittelbarer Nachbarschaft zugrunde liegen (Buchholz et al. 2005). In der klinischen Praxis ist die Bedeutung der PanIN-1 und PanIN-2 daher noch unklar, wohingegen die PanIN-3 als klinisch signifikant eingestuft werden (Hruban et al. 2004).

Als Ausgangspunkt für das Pankreaskarzinom kommen drei unterschiedliche Zelltypen in Frage. Die verbreitetste Meinung ist, dass das PDAC aus dem Gangepithel des Pankreas entsteht (Cubilla et al. 1975). Andere gehen davon aus, dass eine Metaplasie der Azini stattfindet, deren Zellen entarten und sich zu einem Karzinom entwickeln (Parsa et al. 1985). Diese Theorie ist nach aktuellem Forschungsstand am ehesten zutreffend. Eine dritte Theorie besagt, dass das Karzinom aus Stamm-

zellen des Pankreas hervorgeht (Li et al. 2007). Unterstützt wird diese Theorie durch die Entdeckung, dass in den Karzinomzellen die Hedgehog-, Notch- und Wnt-Signalwege vermehrt aktiviert sind, die charakteristisch für embryonale Zellen sind (Li et al. 2007).

Grund für die Entstehung des Pankreaskarzinoms sind verschiedene charakteristische Genmutationen, die unterschiedliche Signalwege beeinflussen (Abb. 4).



**Abbildung 4: Hypothese zur Entstehung des PDAC aus gesundem Pankreasgewebe.**

Histologische Präparate von Normalgewebe und den drei PanIN-Stadien bis hin zum invasiven Adenokarzinom. Zudem zeitliche Darstellung des Auftretens charakteristischer Mutationen. Histologisch zeigen sich sowohl strukturelle als auch zelluläre Veränderungen. Es kann keine Korrelation zwischen dem Auftreten der Genmutationen und dem Auftreten histologischer Veränderungen gezeigt werden. Die Durchgängigkeit der Linie repräsentiert die Auftretenswahrscheinlichkeit der Mutation.

*Abbildung entnommen aus Bardeesy et al. 2002.*

Eines der ersten Geschehnisse in der Entstehung des Pankreaskarzinoms ist eine K-ras-Überaktivierung durch eine aktivierende Punktmutation in Codon 12 des K-ras-Gens. Schon in PanIN-1 kann die Überaktivierung von K-ras nachgewiesen werden, die in allen weiteren PanIN-Stadien sowie im PDAC konstant ist (Hruban et al. 1993, Tada et al. 1996). K-ras ist über den MAPK/Akt-Signalweg an der Regulation des Zellzyklus beteiligt. Eine Überaktivierung dieses Gens führt somit zu einem gesteigerten Zellwachstum. Vermutlich als Reaktion auf die Aktivierung des

MAPK-Signalweges kommt es zu einer Überexpression von p21 in den Zellen der Vorläuferläsionen (Kivinen et al. 1999, Biankin et al. 2001).

Ein ebenso früh zu beobachtendes Phänomen ist eine Telomerverkürzung im Genom hyperplastischer Zellen (Van Heek et al. 2002), in Rahmen derer es zur Genominstabilität kommt. Im späteren Verlauf wiederum ermöglicht eine vermehrte Aktivierung der Telomerase die erhöhte Teilungsrate der entarteten Karzinomzellen (Suehara et al. 1997).

Eine besondere Rolle in der Genese des PDAC scheinen die Tumorsuppressoren p16 sowie p53 zu spielen, da beide in fast allen duktaalen Adenokarzinomen verändert sind (Redston et al. 1994, Wilentz et al. 1998).

Eine Inaktivierung des CDKN2A/INK4-Gens, welches für den Tumorsuppressor p16 codiert, konnte bereits in PanIN-1 gezeigt werden. Sie nimmt mit Fortschreiten der PanIN-Stadien bis hin zum invasiven Karzinom zu, wodurch der p16-Spiegel stetig sinkt (Wilentz et al. 1998). p16 spielt eine wichtige Rolle in der Kontrolle des G1/S-Phasen-Übergangs, indem es die CDK4/CDK6-vermittelte Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins inhibiert und somit den Eintritt in die S-Phase verhindert (Liggett et al. 1998).

Die Tumorsuppressorgene TP53 sowie SMAD4/DPC4 sind hingegen ausschließlich in PanIN-2, -3 sowie im invasiven PDAC inaktiviert. Hierbei nimmt die Inaktivierungsfrequenz von PanIN-2 auf -3 zu, bei der anschließenden Entwicklung zum PDAC hin bleibt sie jedoch unverändert (Hruban et al. 2000, Yamano et al. 2000, Wilentz et al. 2000). Die Inaktivierung von TP53 führt zu einer verminderten Bildung von p21 (Hu et al. 1998). Die Abnahme der p21-Konzentration ist ein entscheidender Schritt in der Entstehung des PDAC aus seinen Vorläuferläsionen (Morton et al. 2010). Sie ermöglicht den Zellen, sowohl apoptotische Signale als auch Zellzyklus-inhibitorische Mechanismen zu umgehen. Ebenso wachstumsfördernd ist die Inaktivierung von SMAD4, welches als Transkriptionsfaktor über den TGF- $\beta$ -Signalweg in den Nukleus eingebracht wird und dort sowohl einen G1/S-Arrest als auch die Induktion der Apoptose erwirkt. Zusätzlich beeinflusst SMAD4 die Angiogenese, indem es zu einer verminderten Expression des endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) führt (Schwarte-Waldhoff et al. 2002).

In Studien konnte belegt werden, dass das Fortbestehen der „Antitumor-Barriere“ aus den Tumorsuppressoren p16 und p53 in Mausmodellen zu einer Hemmung des PDAC-Wachstums führt (Bardeesy et al. 2006).

Ein Charakteristikum des Pankreaskarzinoms ist das ausgeprägte aktive Stroma, welches bis zu 90% des Tumorumfanges ausmachen kann. Es besteht aus Fibroblasten, Blut- und Lymphgefäßen, die in Extrazellulärmatrix eingebettet sind (Chu et al. 2007). Schon im PanIN-2-Stadium kommt es um den Tumor herum zu einer desmoplastischen Stromareaktion, die durch endokrine sowie autokrine Mechanismen hervorgerufen wird (Mahadevan et al. 2007). Die desmoplastische Stromareaktion ist also keine Host-versus-Graft-Reaktion, sondern wird von den Karzinomzellen selbst initiiert (Korc 2007) und hat wesentlichen Einfluss auf die Tumorprogression (Hwang et al. 2008). Eine wichtige Rolle in der Entstehung und dem Umbau der Extrazellulärmatrix spielen pankreatische Sternzellen (Apte et al. 1998). Diese periazinären Zellen werden durch Wachstumsfaktoren, wie den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) (Blaine et al. 2009), Zytokine sowie oxidativen Stress zur Sezernierung von Kollagen, Fibronectin und matrixabbauenden Enzymen angeregt (Vonlaufen et al. 2008). Diese Enzyme, unter anderem Matrix-Metalloproteinasen, ermöglichen im Zusammenspiel mit ihren Inhibitoren einen regulierten Abbau des physiologischen Stromas, welcher für das invasive Wachstum des Tumors notwendig ist (Ellenrieder et al. 2000). Durch seine Hypovaskularität verhindert das Stroma zudem die Anflutung von Medikamenten im Pankreaskarzinom, ein Grund für die enorme Resistenz des PDAC gegen Chemotherapeutika (Burris et al. 1997, Komar et al. 2009). Ein möglicher Therapieansatz wird in der Inhibition des Sonic Hedgehog-Signalweges gesehen, der im Pankreaskarzinom vermehrt aktiviert ist (Thayer et al. 2003). Dieser Signalweg initiiert über die Aktivierung der Gli-Transkriptionsfaktoren eine desmoplastische Stromareaktion in der Umgebung der Karzinomzellen (Bailey et al. 2008). Die Inhibition des Signalweges führt zum Abbau der anabol wirkenden Transkriptionsfaktoren und somit zu einer Stromareduktion, wodurch eine verbesserte Durchblutung des Karzinoms und eine verstärkte Anreicherung von Chemotherapeutika erreicht werden soll (Olive et al. 2009). Nach entsprechender Behandlung fielen die Tumore jedoch durch eine verminderte Differenzierung, ein aggressiveres Wachstum und eine höhere Metastasierungsrate auf (Rhim et al. 2014). Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass das Stroma sowohl tumorfördernde als auch -inhibierende Komponenten besitzt (Neesse et al. 2015).

Bei homozygoten BRCA2-Mutationen besteht ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms (Easton et al. 1999). Die heterozygote Mutation des

BRCA2-Gens führt hingegen nicht zu einem vermehrten Auftreten von PanIN, da der Verlust des gesunden Allels erst spät in der Entwicklung des Pankreaskarzinoms stattfindet (Goggins et al. 2000).

### 1.3 Kinome-wide Screening

Das Kinom beschreibt die Gesamtheit aller Kinasen des menschlichen Genoms, wobei rund 1,7% des eukaryotischen Genoms für 518 Proteinkinasen kodieren (Manning et al. 2002). Kinasen sind Phosphotransferasen; sie katalysieren den Transfer von Phosphatgruppen von einem Donor (zumeist ATP) auf eine Aminosäure. Hierdurch werden die Substratproteine in ihrer Aktivität modifiziert oder ihre Lokalisation in der Zelle beeinflusst (Koolman et al. 2009). Die Phosphorylierung dient folglich der Regulation zahlreicher intrazellulärer Prozesse sowie interzellulärer Kommunikation. Aufgrund ihrer zentralen Rolle in der Regulation biologischer Vorgänge in der Zelle haben Dysfunktionen von Proteinkinasen umfangreiche Folgen. So werden Mutationen im Genom der Kinasen als häufige Ursache für die Entstehung maligner Tumoren angesehen (Manning et al. 2002). Dementsprechend stellen sie einen wichtigen Aspekt im Verständnis der Krebsentstehung sowie einen Angriffspunkt in der Therapie maligner Erkrankungen dar.

Um Kinasen ausfindig zu machen, die eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Pankreaskarzinoms spielen, wurde in Zusammenarbeit mit dem Naturwissenschaftlichen und medizinischen Institut (NMI) in Reutlingen ein Screening durchgeführt, welches das gesamte humane Kinom umfasste (Buchholz et al., unveröffentlichte Ergebnisse). Hierzu wurden die Kinasen sowohl in Panc-1-Zellen (Zellen des humanen Pankreaskarzinoms) als auch in HEK293-Zellen (nicht dysplastische, humane embryonale Nierenzellen) durch RNA-Interferenz herunter reguliert. Die HEK-293-Zellen wurden als gesunde Kontrolle eingesetzt. In hoch-parallelisierten Ansätzen wurde jeweils ein Target, also eine bestimmte Kinase, mithilfe von siRNAs ausgeschaltet. Im Anschluss wurde in Apoptose-Assays die Aktivierung von Apoptose-induzierenden Caspasen beobachtet. Der Vergleich der Apoptoseinduktion in den transformierten zu den nichttransformierten Zellen wurde mithilfe des Z-Scores dargestellt und fungierte als Basis für die Auswahl neuer potenzieller Kandidatengene (Abb. 5).

Gene symbol	Z-Score	Gene symbol	Z-Score	Gene symbol	Z-Score
1 BCKDK	13.09	17 PLXNA4	6.24	33 MUSK	4.00
2 PINK1	12.56	18 MYLK4	5.99	34 TBK1	3.95
3 WNK1	11.98	19 INSRR	5.58	35 ITK	3.80
4 PACSIN3	10.57	20 ALPK2	5.47	36 MPP6	3.65
5 PFTK2	9.67	21 CDC7	5.29	37 NEK7	3.64
6 NRBP2	9.24	22 ULK3	5.10	38 ITPKA	3.62
7 BMP2K	8.31	23 GSG2	5.05	39 ROR1	3.59
8 SLAMF6	7.97	24 RPS6KL1	4.96	40 CAMKK1	3.39
9 PTK2B	7.87	25 MYLK2	4.72	41 NUA2	3.35
10 DDR2	7.61	26 PLXNB1	4.67	42 FN3KRP	3.34
11 IGSF22	7.35	27 STK11IP	4.44	43 ADPGK	3.32
12 PIP5K1C	7.17	28 TLK2	4.40	44 MGC42105	3.32
13 AK5	7.10	29 TSSK6	4.39	45 MAGI2	3.19
14 HIPK4	6.66	30 CDC2L5	4.05	46 HIPK2	3.05
15 IRAK4	6.56	31 PRKD3	4.03	47 STYK1	3.03
16 PANK4	6.30	32 TTK	4.01		

### Abbildung 5: Kinome-wide Screening

Darstellung der potenziellen Kandidatengene sortiert nach Z-Score. Je höher der Z-Score, desto stärker war die Apoptoseinduktion nach Knockdown der entsprechenden Kinase in den transformierten Zellen im Vergleich zu den nichttransformierten Zellen.

*Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Brajesh P. Kaistha 2011.*

Einer der Kandidaten, die bei dem Kinome-wide Screening ausgewählt wurden, ist die BCKDK. Ihre Inaktivierung führte in hohem Maße zu einer spezifischen Apoptoseinduktion in den transformierten Zellen, nicht aber in den nichttransformierten Kontrollen. In der vorliegenden Arbeit wird die BCKDK näher charakterisiert und ihre potenzielle Rolle in der Pathologie des Pankreaskarzinoms untersucht.

## 1.4 Die Branched-Chain $\alpha$ -Ketoacid Dehydrogenase-Kinase

Die Branched-Chain  $\alpha$ -Ketoacid Dehydrogenase-Kinase (BCKDK) bildet gemeinsam mit den Pyruvat-Dehydrogenase-Kinasen die Familie der mitochondrialen Proteinkinasen (Harris et al. 1995). Funktionell ist die BCKDK eine Serin-Proteinkinase, zeigt jedoch keine Sequenzübereinstimmungen mit anderen eukaryotischen Proteinkinasen (Harris et al. 1995). Stattdessen finden sich Sequenzähnlichkeiten zu prokaryotischen Histidin-Proteinkinasen (Popov et al. 1992, Harris et al. 1993). BCKDK ist auf Chromosom 16p11.2 codiert (Muller et al. 2004). Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz des humanen Proteins zeigt Abbildung 6.



AATCGGCACGAGCATTTTGGGTGCGCTGGGTCTCAGTCCTAGCGGATCCTCAGTCCTAGCGGCCACCGGGTCTGAAAGGAGCAAGACG	90
-30 -20 -10	
M I L A S V L R S G P G G G L P L R P L L G P A L A L R A R	
ATGATCCTGGCGTCGGTGCTGAGGAGCGGTCCCGGGGGCGGGCTTCCGCTCCGGCCCCCTCCTGGGACCCGCACTCGCGCTCCGGGCCCCG	180
1 10 20 30	
S T S A T D T H H V E M A R E R S K T V T S F Y N Q S A I D	
TCGACGTGGGCCACCGACACACACCGTGGAGATGGCTCGGGAGCGCTCCAAGACCGTCACCTCCTTTTACAACAGTCGGCCATCGAC	270
40 50 60	
A A A E K P S V R L T P T M M L Y A G R S Q D G S H L L K S	
GCGGCAGCGGAGAAGCCCTCAGTCCGCCTAACGCCACCATGATGCTCTACGCTGGCCGCTCTCAGGACGGCAGCCACCTTCTGAAAAGT	360
70 80 90	
A R Y L Q Q E L P V R I A H R I K G F R C L P F I I G C N P	
GCTCGGTACCTGCAGCAAGAACTTCCAGTGAGGATTGCTCACCGCATCAAGGGCTTCCGCTGCCTTCTTTTCATTGGCTGCAACCCC	450
100 110 120	
T I L H V H E L Y I R A F Q K L T D F P P I K D Q A D E A Q	
ACCATACTGCACGTGCATGAGCTATATATCCGTGCCCTTCAGAAAGTGACAGACTTCCTCCGATCAAGGACCAGGCGGACGAGGCCAG	540
130 140 150	
Y C Q L V R Q L L D D H K D V V T L L A E G L R E S R K H I	
TACTGCCAGTGGTGGACAGCTGCTGGATGACCACAAGGATGGTGACCCCTCTGGCAGAGGGCCTACGTGAGAGCCGGAAGCACATA	630
160 170 180	
E D E K L V R Y F L D K T L T S R L G I R M L A T H H L A L	
GAGGATGAAAAGCTCGTCCGCTACTTCTGGACAAGACGCTGACTTCGAGGCTTGAATCCGCATGTTGGCCACGCATCACCTGGCGCTG	720
190 200 210	
H E D K P D F V G I I C T R L S P K K I I E K W V D F A R R	
CATGAGGACAAGCCTGACTTTGTCCGCATCATCTGTACTCGTCTCTACCAAAGAAGATTATTGAGAAGTGGGTGGACTTTGCCAGACGC	810
220 230 240	
L C E H K Y G N A P R V R I N G H V A A R F P F I P M P L D	
CTGTGTGAGCACAAATGATGGCAATGCGCCCCGTGTCGCGCATCAATGGCCATGTGGCTGCCCGGTTCCCTTCATCCCTATGCCACTGGAC	900
250 260 270	
Y I L P E L L K N A M R A T M E S H L D T P Y N V P D V V I	
TACATCCTGCCGAGCTGCTCAAGAATGCCATGAGAGCCAAATGGAGAGTCACCTAGACACTCCCTACAATGTCCAGATGTGGTCATC	990
280 290 300	
T I A N N D V D L I I R I S D R G G G I A H K D L D R V M D	
ACCATGCCCAAAATGATGTGATCTGATCATCAGGATCTCAGACCGTGGTGGAGGAATCGCTCACAAGATCTGGACCGGGTCATGGAC	1080
310 320 330	
Y H F T T A E A S T Q D P R I S P L F G H L D M H S G A Q S	
TACCATTCTACTACTGCTGAGGCCAGCACAGGACCCCCGGATCAGCCCCCTCTTTGGCCATCTGGACATGCATAGTGGCGCCAGTCA	1170
340 350 360	
G P M H G F G F G L P T S R A Y A E Y L G G S L Q L Q S L Q	
GGACCCATGCACGGCTTTGGCTTCGGGTTGCCACGTCACGGGCCCTACGCGGAGTACCTCGGTGGGTCTCTGCAGCTGCAGTCCCTGCAG	1260
370 380	
G I G T D V Y L R L R H I D G R E E S F R I E N D	
GGCATTGGCAGGACGCTCTACCTGCGGCTCCGCCACATCGATGGCGGGAGGAAAGCTTCCGATCTGACCCACAGCCCTTTGGCCTGCT	1350
CACCCGACCAGCCTGGGCGGCATTCCCTGCAGGACCTCCCGGGTCAGGCAGGCGGGCCCCCTGCTCCACACTGATGCATCTTGGGTCC	1440
CTGGGCACTGCTCTGCTCAACAGGGTCCAAGGGACCCAGACAGATGGACTTAGATGGAGTTGCCTCCTCGCCTCCAGAACTTGGAGCAG	1530
GGAAAGTGGGCACCTGAGGCCTCCAGCACAGTTCCTGTCATTCTGTTCTCTGGGGAACCCCACTCTGACCTGTTATTAAGTTACATT	1620
TTGAATGCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1649

**Abbildung 6: Nukleotid- und Aminosäuresequenz von humanem BCKDK.**

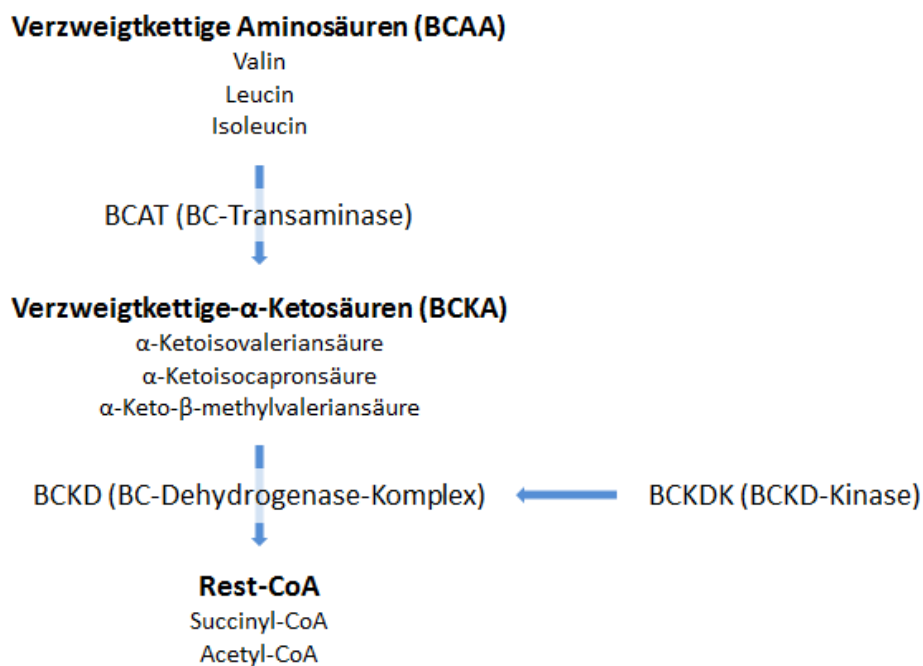
Die ATG-Sequenz bei Base 91 stellt das Startcodon dar. Darauf folgend findet sich die mitochondriale Zielsequenz mit einer Länge von 30 AS. Im Anschluss beginnt das reife Protein, welches aus 382 AS besteht und mit dem Stopcodon bei Base 1327 endet. Insgesamt hat das reife Protein ein Gewicht von 43.288 kDa.

*Abbildung entnommen aus Suryawan et al. 1998.*

Ein BCKDK-Monomer besteht aus zwei Domänen: einem 4-Helix-Bündel sowie der Nukleotid-Binde-Domäne. Diese beiden Domänen sind durch einen „Linker“ verbunden, der zu Konformationsänderungen im Protein führen kann. Die beiden Monomere verbinden sich durch direkte Interaktion an den Nukleotid-Binde-Domänen zu einem Homodimer, in Lösung auch zu Tetrameren (Machius et al. 2001). Die BCKDK liegt in freier und gebundener Form vor, wobei nur die gebundene Form katalytisch aktiv ist. Unter normalen Bedingungen überwiegt die freie Form (Obayashi et al. 2001).

BCKDK ist ein wichtiges Regulationsenzym im Abbau der verzweigtkettigen Aminosäuren (Branched Chain Amino Acids, BCAA) Leucin, Isoleucin und Valin. Diese sind essentiell für den Aufbau von Proteinen oder dienen als Stickstoffdonatoren für den Aufbau anderer Aminosäuren und Neurotransmitter wie Glutamat und GABA. Leucin und seine  $\alpha$ -Ketonsäure,  $\alpha$ -Ketoisocaproat, wirken zudem anabolisch, indem sie die Insulinsekretion der  $\beta$ -Zellen des Pankreas fördern (Malaisse et al. 1980).

Der Abbau verzweigtkettiger Aminosäuren findet in zwei Schritten statt (Abb. 7). Im ersten Schritt werden Leucin, Isoleucin und Valin durch die BCAT reversibel zu ihren  $\alpha$ -Ketonsäuren transaminiert (Sweatt et al. 2004). Im Anschluss wird durch die BCKD eine irreversible oxidative Decarboxylierung durchgeführt, wodurch verzweigtkettige Acyl-CoA-Ester entstehen (Harris et al. 2005).



**Abbildung 7: Abbau der verzweigtkettigen Aminosäuren.**

Im ersten Schritt werden die verzweigtkettigen Aminosäuren durch die BCAT zu verzweigtkettigen  $\alpha$ -Ketonsäuren reversibel transaminiert. Im zweiten Schritt werden diese durch die BCKD irreversibel zu verzweigtkettigen Acyl-CoA-Ester oxidiert. Kontrolliert wird der irreversible Schritt des Katabolismus durch die BCKDK.

*Quelle: Harris et al. 1992 und 2005, Joshi et al. 2006, Sweatt et al. 2004.*

BCKDK hat eine starke Substratspezifität zu BCKD (Harris et al. 1992) und stellt ihren primären Regulator dar (Joshi et al. 2006). Die Aktivität des BCKD-Komplexes ist umgekehrt proportional zur Aktivität der Kinase und wird daher als

Schlüsselenzym des BCAA-Stoffwechsels angesehen (Shimomura et al. 2001). Gegenspieler der BCKDK ist die BDP (Cook et al. 1984), eine Proteinphosphatase, die ebenfalls mitochondrial gelegen ist und im PPM1K-Gen codiert wird (García-Cazorla et al. 2014).

Die BCK-Dehydrogenase besteht aus 3 Enzymen, die gemeinsam einen Komplex bilden: E1 $\alpha$ + $\beta$  (*verzweigtkettige- $\alpha$ -Ketosäuren-Dehydrogenase*), E2 (*Dihydrolipoyl-Verzweigtkettigen-Transacylase*) und E3 (*Dihydrolipoyl-Dehydrogenase*) (Harris et al. 1990). BCKDK erkennt das Arginin-288 der E1 $\alpha$ -Untereinheit und bindet daraufhin an die E2-Untereinheit (Popov et al. 1997). Diese Bindung aktiviert die Kinase, welche die E1- $\alpha$ -Untereinheit an Serin-293 und Serin-303 im aktiven Zentrum reversibel phosphoryliert (Odessey 1982). Durch die Phosphorylierung wird eine negative Ladung erzeugt, welche die Affinität von E1 zu E2 senkt, wodurch die Untereinheiten anfälliger für den Abbau durch Proteasen werden und BCKD inaktiviert wird (Harris et al. 1997).

Während der BCKD-Enzymkomplex in den Mitochondrien aller Zellen vorhanden ist, finden sich BCKDK-Proteine vor allem in der Skelettmuskulatur und in geringer Menge in der Leber, weshalb die Leber als Hauptort der Oxidation angesehen wird (Suryawan et al. 1998, Sweatt et al. 2004). Die Menge sowie die Stabilität der BCKDK-mRNA ist in allen Geweben gleich, was auf eine gewebsspezifische Regulation des BCKDK-Gehalts auf posttranskriptionaler Ebene schließen lässt (Müller et al. 2004).

Kurzfristige wie auch langfristige Regulationsmechanismen für BCKDK sorgen für eine Anpassung des BCAA-Haushalts an die jeweilige Stoffwechsellage (Shimomura et al. 2001).

Kurzfristig sorgt  $\alpha$ -Ketoisocaproat (KIC) durch allosterische Bindung an BCKDK für eine Dissoziation der Kinase vom BCKD-Komplex und damit für eine Aufhebung der Inhibition, wodurch es seinen eigenen Abbau initiiert (Tso et al. 2013). Demgegenüber liegt die BCKDK bei Proteinmalnutrition hauptsächlich in gebundener Form vor (Harris et al. 1995). Durch diesen Mechanismus werden bei BCAA-Mangel verzweigtkettige Aminosäuren konserviert, um für die Proteinsynthese zur Verfügung zu stehen. Ein Proteinmangel bewirkt zudem langfristig eine gesteigerte Expression von BCKDK (Popov et al. 1995).

Zusätzlich beeinflussen verschiedene Hormone die BCKDK-Expression auf prätranslationaler Ebene. So steigert Thyroxin (T<sub>4</sub>) die Expression, während Glu-

kokortikoide sie vermindern (Kobayashi et al. 2000, Huang et al. 1999). PPAR- $\alpha$ -Agonisten, die sogenannten Fibrate, supprimieren den Gehalt an BCKDK-mRNA, was auf eine mögliche Rolle des PPAR- $\alpha$  als Transkriptionsfaktor von BCKDK hinweisen könnte (Harris et al. 2001). Beim Diabetes mellitus Typ 2 mit erhöhten Insulinspiegeln wird das Bindungsverhalten von BCKDK verändert, wodurch seine Aktivität zunimmt (Doisaki et al. 2010).

Durch BCKDK-loss-of-function-Mutationen kommt es zu einem Absinken der BCAA-Spiegel. Folge ist zum einen eine Wachstumsretardierung bedingt durch den Proteinmangel und das fehlende anabolische Signal durch Leucin (Joshi et al. 2006). Zum anderen kommt es zu neurologischen Auffälligkeiten bis hin zu Epilepsie und Autismus (Novarino et al. 2012, García-Cazorla et al. 2014). Diese Form der Erkrankungen kann durch BCAA-Supplementierung therapiert werden (Poot 2013).

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Das duktale Adenokarzinom des Pankreas ist eine der am schlechtesten therapierbaren Krebserkrankungen weltweit. Die Sterberate konnte seit Beginn der Aufzeichnungen trotz intensiver Forschung im diagnostischen sowie therapeutischen Bereich nicht verbessert werden.

Mittels Hochdurchsatzanalysen wurden in den letzten Jahren verschiedene Gene identifiziert, die eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Pankreaskarzinoms spielen und somit Zielgene für Therapien darstellen könnten. Eines ist das BCKDK-Gen, welches für seine Funktionen im Stoffwechsel verzweigtkettiger Aminosäuren bekannt ist.

In der vorliegenden Arbeit sollten folgende Fragestellungen adressiert werden:

- 1) Welchen Einfluss hat die BCKDK auf die Proliferation und Apoptose in verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien?
- 2) Welche Rolle spielt die BCKDK in der Pathogenese und Progression des Pankreaskarzinoms?

## 2. Materialien

### 2.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Kat.-Nr.	Hersteller
Blotting-Papier	742113	Macherey-Nagel (Düren)
Combitips® advanced, 2,5ml	0030089448	Eppendorf (Hamburg)
Combitips® advanced, 5ml	0030089456	
Combitips® biopur, 5ml	0030089669	
Deckgläser	BB018024 A1	Menzel-Gläser (Braunschweig)
Einwegpipetten 10ml 25ml	861254001 861685001	Sarstedt (Nümbrecht)
Falcon™ Round-Bottom Polystyrene Tube, 5ml	352052	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
Gewebekulturflasche 25cm², 50ml 75cm², 250ml	690160 658170	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Gewebekulturplatten 6-Loch	831839300	Sarstedt (Nümbrecht)
Gewebekulturplatten 12-Loch 24-Loch	665180 662160	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Gewebekulturschalen 60 x 15mm 100 x 20mm	628160 664160	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Kosmetiktuch	2054692	Igefa (Ahrensfelde)
Latexhandschuhe	1122750	VWR (Darmstadt)
Microplatten 96-Loch, F-Boden	655162	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Nitrocellulose Blotting Membrane	10600015	GE Healthcare (Chalfont St Giles, GB)
Pipettenspitzen Diamond D10 D200 D1000	F161630 F161930 F161670	Gilson (Middleton, USA)
Pipettenspitzen, 1000µl	686290	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Polysterengefäße, 12ml	164160	Greiner Bio-One (Frickenhausen)

Fortsetzung Tabelle 2: verwendete Verbrauchsmaterialien

Präzisionswischtücher	KC 7552	Kimtech Science (Reigate, UK)
Reagiergefäße, Polypropylen		
0,5ml	72699	Sarstedt (Nümbrecht)
1,5ml	72706	
2,0ml	72695500	
2,0ml ohne Stopfen	72708	
Serologische Pipetten		
2ml	710180	Greiner Bio-One (Frickenhäusen)
5ml	606180	
50ml	768180	
ViewPlate-96, Black, TC	6005182	Perkin Elmer (Waltham, USA)
Zellschaber	831830	Sarstedt (Nümbrecht)
Zentrifugenröhren, Polypropylen		
15ml	62554502	Sarstedt (Nümbrecht)
50ml	62547254	

## 2.2 Chemikalien

Tabelle 3: verwendete Chemikalien

Reagenz	Kat.-Nr.	Hersteller
2-Propanol	33539	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Acrylamid-Lösung (30%)	A4983	AppliChem (Darmstadt)
Amersham™ ECL Advance Western Blotting Detection Reagents	RPN2135	Amersham Biosciences (Amersham, UK)
Amersham™ ECL Plus Western Blotting Detection Reagents	RPN2132	Amersham Biosciences (Amersham, UK)
Ammoniumpersulfat (APS)	101200	Merck (Darmstadt)
Bromphenolblau	B0126	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Coomassie Plus™ Protein Assay Reagent	23238	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Dithiothreitol (DTT)	20710	Serva Electrophoresis (Heidelberg)
Ethanol	32205	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	R013	G-Biosciences (St. Louis, USA)
FxCycle™ Violet Stain	F10347	Life Technologies (Carlsbad, USA)

Fortsetzung Tabelle 3: verwendete Chemikalien

Glycerin	3783	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Glycin	3908	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Kälberserumalbumin (BSA)	P8994	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Kaliumdihydrogenphosphat	3904	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Methanol	32213	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Milchpulver	T145	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Natriumchlorid (NaCl)	0962	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Natriumfluorid (NaF)	S7920	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Natriumpyrophosphat Decahydrat ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ )	S9515	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	P7626	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Ponceau S solution	P7170	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Protease Arrest™	786-108	G-Biosciences (St. Louis, USA)
Rotiphorese® Gel 30	3029	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Salzsäure rauchend 37% (HCl)	100317	Merck (Darmstadt)
SDS ultra pure	2326	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
SiLentFect™ Lipid Reagent	170-3361	Bio-Rad (Hercules, USA)
SYBR® Green PCR Master Mix	4309155	Applied Biosystems (Carlsbad, USA)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	2367	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Thiazolylblau (MTT)	4022	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Trinatriumtetraoxovanadat ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ )	450243	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
TRIS Hydrochlorid	9090	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Triton X 100	3051	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Tween® 20	9127	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)

## 2.3 Laborgeräte

Tabelle 4: verwendete Laborgeräte

Gerät	Hersteller
7500 Fast Real-Time PCR Systems	Applied Biosystems (Carlsbad, USA)
AccuBlock™ Digital Dry Bath	Labnet International, Inc. (Edison, USA)

Fortsetzung Tabelle 4: verwendete Laborgeräte

Autoklav 3850 EL	Tuttnauer Europe B.V. (Breda, Niederlande)
Brutschrank 6000	Heraeus Instruments (Hanau)
Chemocam	Intas (Göttingen)
DNA Engine® Thermal Cycler	Biorad Laboratories GmbH (München)
Durchflusszytometer LSR II	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
Einkanalpipetten Discovery Comfort DV10C (0,5-10 µl) DV20C (2-20 µl) DV200C (20-200 µl) DV1000C (100-1000 µl)	Abimed (Langenfeld)
Electrophoresis Power Supply EPS3500	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
Elektrophoresekammer	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Feinwaage Mettler AE163	Mettler-Toledo GmbH (Gießen)
FlowJo	Tree Star Inc (Ashland, USA)
Gefrierschrank	Liebherr (Bulle, Schweiz)
Glasware	Schott (Mainz)
KS 250 basic	IKA Labortechnik (Staufen)
Kühlschrank	Liebherr (Bulle, Schweiz)
Labsonic U	B. Braun (Melsungen)
Lichtmikroskop	Olympus (Shinjuku, Japan)
Luminometer Centro LB 960	Berthold Technologies (Bad Wildbad)
Magnetrührer MR2002	Heidolph Instruments (Schwabach)
Multipette	Eppendorf (Hamburg)
Multiskan FC	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Nanodrop 1000	PeqLab Biotechnologies GmbH (Erlangen)
pH-Meter 761 Calimatic	Knick (Berlin)
Pipettboy Acu	Integra Biosciences (Zizers, CH)
Reax 2000	Heidolph Instruments (Schwabach)
See-Saw Rocker SSL4	Stuart (Staffordshire, UK)
Sprout™	Heathrow Scientific LLC (Illinois, USA)
Sterilbank Bio-II-a	Telstar Life Science solutions (Terrassa, Spanien)
Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg)
Tiefkühlager Hera freeze	Thermo Electron Corporation (Waltham, USA)



Fortsetzung Tabelle 4: verwendete Laborgeräte

Vortex Genius 3	IKA Labortechnik (Staufen)
Vortexer VF2	IKA Labortechnik (Staufen)
Western Blot Apparatur	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Zählkammer Neubauer improved	Carl Roth (Karlsruhe)
Zentrifuge Heraeus Multifuge 3SR+	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Zentrifuge Heraeus Pico 17	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

## 2.4 Zellkultur

### 2.4.1 Nährmedien und Zusätze für die Kultivierung von Zelllinien

Tabelle 5: verwendete Nährmedien und Zusätze

Reagenz	Kat.-Nr.	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Low Glucose, Pyruvate	31885-023	GIBCO, Life Technologies (Carlsbad, USA)
Dulbecco's Phosphatpuffersalzlösung (PBS), -/- ( $Mg^{2+}/Ca^{2+}$ )	14190-094	GIBCO, Life Technologies (Carlsbad, USA)
FBS South American	10270106	GIBCO, Life Technologies (Carlsbad, USA)
Trypsin-EDTA (0,25%)	25200056	GIBCO, Life Technologies (Carlsbad, USA)

### 2.4.2 Humane Zelllinien für die *in vitro*-Experimente

Tabelle 6: verwendete Zelllinien

Zelllinie	Abstammung	Herkunft	Referenz
PANC-1	humanes Pankreaskarzinom	ATCC, American Type Culture Collection (Manassas, USA)	(Lieber et al. 1975)
PaTu-8988t	humanes Pankreaskarzinom/ Lebermetastase	H. P. Elsässer (Marburg)	(Elsässer et al. 1992)
SUIT2-007	humanes Pankreaskarzinom/ Lebermetastase	Iwamura T. (Japan)	(Iwamura et al. 1987)

## 2.5 Protein-Standard

Tabelle 7: verwendeter Protein-Standard

Name	Kat.-Nr.	Hersteller
PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10-170 kDa	26616	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

## 2.6 Kits

Tabelle 8: verwendete Kits

Kit	Kat.-Nr.	Hersteller
Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescent)	11669915001	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Omniscript Reverse Transcription Kit	205111	Qiagen (Venlo, Niederlande)
peqGOLD Total RNA Kit	12683402	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)

## 2.7 Oligonukleotide

### 2.7.1 cDNA-Synthese

Tabelle 9: verwendete Primer für die cDNA-Synthese

Name	Sequenz	Hersteller
Oligo dT	5'-TTT TTT TTTT TTT-3'	Biomers GmbH (Ulm)

### 2.7.2 Expressions-Kontrolle von BCKDK

Tabelle 10: verwendete Primer für die qRT-PCR

Name	Sequenz	Hersteller
hBCKDK_forw	5'-TGG TTC GTG TCC CAG TCT CTT AC-3'	Biomers GmbH (Ulm)
hBCKDK_rev	5'- ATC CCA CTC CCA CCA AAT CA-3'	Biomers GmbH (Ulm)
RPLP0_forw	5'-AGT TTC TCC AGA GCT GGG TTG T-3'	Biomers GmbH (Ulm)
RPLP0_rev	5'-TGG GCA AGA ACA CCA TGA TG-3'	Biomers GmbH (Ulm)

### 2.7.3 „Non silencing“-siRNA

Tabelle 11: verwendete ns-siRNA

Name	Kat.-Nr.	Hersteller
Silencer® Negative Control #2 siRNA	AM4637	Applied Biosystems (Carlsbad, USA)

### 2.7.4 Repression von BCKDK

Tabelle 12: verwendete siRNAs

Name	Sequenz	siRNA ID	Hersteller	Bezeichnung in dieser Arbeit
Silencer® siRNA gegen BCKDK	5'-GGCUUGGAAUC CGCAUGUUtt-3'	110905	Applied Biosystems (Carlsbad, USA)	siRNA 1
Silencer® siRNA gegen BCKDK	5'-CCUAGACACUC CCUACAAUtt-3'	140032	Applied Biosystems (Carlsbad, USA)	siRNA 3
Silencer® Select gegen BCKDK	5'-AGACCGUCACC UCCUUUUAtt-3'	s20126	Applied Biosystems (Carlsbad, USA)	siRNA 5

## 2.8 Lösungen für die Polyacrylamid-Gele

### 2.8.1 Rezept für die Trenngellösung

Tabelle 13: verwendetes Rezept für die Trenngellösung, Ansatz für 2 Gele

Trenngellösung	10% Gel	12% Gel	15% Gel
Trenngelpuffer (Protokoll s. Kapitel 2.9)	3,0ml	3,0ml	3,0ml
H <sub>2</sub> O dd.	4,4ml	3,6ml	2,4ml
Acrylamid-Lösung (30%)	4,0ml	4,8ml	6,0ml
Glycerin	0,6ml	0,6ml	0,6ml
10%iges APS	20µl	20µl	20µl
TEMED	20µl	20µl	20µl

## 2.8.2 Rezept für die Sammelgellösung

Tabelle 14: verwendetes Rezept für die Sammelgellösung (Endvolumen: 100ml)

Sammelgellösung	
Sammelgelpuffer (Protokoll s. Kapitel 2.9)	25ml
H <sub>2</sub> O dd.	59ml
Acrylamid-Lösung (30%)	16ml

## 2.9 Puffer für Western Blot-Analysen

Tabelle 15: verwendete Pufferlösungen

Trenngelpuffer	Sammelgelpuffer	10x Laufpuffer	Blotting Puffer
1,5M Tris Base	0,5M Tris Base	200mM Tris Base	100ml Laufpuffer ohne SDS
0,4%iges SDS	0,4%iges SDS	1,92M Glycin	200ml Methanol
pH 8,8	pH 6,8	1%iges SDS	700ml H <sub>2</sub> O dd.
4x SDS-Probenpuffer			10x TBS
2g Tris HCl (253mM) + 25mg Bromphenolblau gelöst in 25ml destilliertem H <sub>2</sub> O			24,2g Tris Base
Auffüllen der Lösung mit 45ml Glycerin			80g NaCl
pH 6,8			15ml 37%ige HCl
Hinzufügen von 5ml 20%iger SDS-Lösung			pH 7,6

## 2.10 Antikörper für Western Blot-Analysen

### 2.10.1 Primär-Antikörper

Tabelle 16: verwendete Primär-Antikörper

Name	Herkunft	Kat.-Nr.	Hersteller	Verdünnung
anti- $\beta$ -Aktin	Kaninchen	sc-1616 HRP	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)	1:30.000

Fortsetzung Tabelle 16: verwendete Primär-Antikörper

anti-BCKDK	Maus	SAB1406968	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	1:1000
Antigensequenz:				
MILASVLRSG	PGGGLPLRPL	LGPALALRAR	STSATDTHHV	EMARERSKTV
TSFYNQSAID	AAAEKPSVRL	TPTMMLYAGR	SQDGSHELLKS	ARYLQQELPV
RIAHRIKGFR	CLPFIIGCNP	TILHVHELYI	RAFQKLTDFP	PIKDQADEAQ
YCQLVRQLLD	DHKDVVTLA	EGLRESRKHI	EDEKLVRYFL	DKTLTSRLGI
RMLATHHLAL	HEDKPDFVGI	ICTRLSPKKI	IEKWVDFARR	LCEHKYGNAP
RVRINGHVAA	RFPFIPMPLD	YILPELLKNA	MRATMESHLD	TPYNVPDVVI
TIANNVDVLI	IRISDRGGGI	AHKDLDRVMD	YHFTTAEAST	QDPRISPLFG
HLDMHSGAQS	GPMHGFGL	PTSRAYAEYL	GGSLQLQSLQ	GIGTDVYLRL
RHIDGREESF	RI			
anti-C-myc	Maus	sc-40	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)	1:500
anti-Caspase-3	Kaninchen	9662	Cell Signaling Technology (Danvers, USA)	1:1.000
anti-cleaved Caspase-3	Kaninchen	9661	Cell Signaling Technology (Danvers, USA)	1:1.000
anti-Cyclin A	Kaninchen	sc-751	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)	1:1000
anti-Cyclin D1	Kaninchen	ab16663	Abcam (Cambridge, UK)	1:500
anti-p21 Waf1/Cip1	Kaninchen	2947	Cell Signaling Technology (Danvers, USA)	1:1000
anti-p27	Kaninchen	sc-528	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)	1:500
anti-PARP	Kaninchen	9542	Cell Signaling Technology (Danvers, USA)	1:1.000

### 2.10.2 Sekundär-Antikörper

Tabelle 17: verwendete Sekundär-Antikörper

Name	Herkunft	Kat.-Nr.	Hersteller	Verdünnung
anti-Kaninchen HRP- gekoppelt	Ziege	7074	Cell Signaling Technology (Danvers, USA)	1:10.000
anti-Maus HRP- gekoppelt	Pferd	7076	Cell Signaling Technology (Danvers, USA)	1:10.000

### 3. Methoden

#### 3.1 Zellbiologische Methoden

##### 3.1.1 Kultivierung

Die Zellen wurden in DMEM, das mit 10% FBS versetzt worden war (FBS-DMEM), in einer 250ml-Gewebekulturflasche im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Ihr morphologischer Zustand wurde täglich lichtmikroskopisch überwacht.

Die Zellen wurden zweimal wöchentlich passagiert, um ein stetes Wachstum zu gewährleisten. Hierzu wurde bei einer Konfluenz von circa 70% das alte Medium abgesaugt. Im Anschluss wurden die Zellen mit 10ml PBS gewaschen. Da es sich bei den verwendeten Zelllinien des Pankreaskarzinoms (Panc-1, S2-007, PaTu-8988t) um adhärenzte Zellen handelt, mussten sie vor dem Umsetzen abgelöst werden. Hierzu wurden 3ml 0,25%iges Trypsin-EDTA zu den Zellen gegeben und drei Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Ablösen wurden die Zellen mit einer Pipette durch auf- und absaugen vereinzelt und anschließend mit frischem Medium aufgenommen. Je nach Verdopplungszeit der verschiedenen Zelllinien wurden Verdünnungen von 1:3 bis 1:10 hergestellt.

##### 3.1.2 Zellzählung

Zur Zellzahlbestimmung wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Die Zellen wurden sorgfältig vereinzelt und im Anschluss zwischen Deckgläschen und Objektträger pipettiert. In einer Neubauer-Zählkammer entsteht nach Auflegen des Deckglases ein definierter Hohlraum, in dem sich die Zellen durch Kapillarkräfte gleichmäßig verteilen. Es wurden alle Zellen gezählt, die sich innerhalb der vier gekennzeichneten Felder auf dem Objektträger befanden. Um den Zellgehalt je Milliliter zu erhalten, wurde der Mittelwert aus den vier ermittelten Werten gebildet und mit 10<sup>4</sup> multipliziert.

##### 3.1.3 Transiente Transfektion

Um die Funktion der BCKD-Kinase näher zu untersuchen, wurde die Expression des kodierenden Gens in verschiedenen Zelllinien vorübergehend unterdrückt. Hierzu wurden Repressionskonstrukte in Form von small interfering RNA (siRNA)

mithilfe des kationischen Lipidreagenz siLentFect durch Lipofektion in die Zellen eingebracht. Je nach Basenfolge der jeweiligen siRNA (siehe Kapitel 2.7.4) bindet diese in der Zelle an einen definierten Zielbereich der mRNA und führt zu deren Abbau. Es wurden drei verschiedene siRNAs gegen BCKDK sowie eine „non-silencing“-siRNA (ns-siRNA, si-Kontrolle) zur Kontrolle verwendet. Je Versuch wurden also fünf verschiedene Zellsätze ausgesät: die unbehandelten Zellen sowie vier behandelte Sätze: die ns-siRNA und drei verschiedene siRNAs gegen BCKDK (siRNA 1, 3 und 5).

Zunächst wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 70% in verschiedene Zellkulturplatten ausgesät. Nachdem sich die Zellen aus der Suspension gesetzt hatten (circa 8 Stunden), wurde das Transfektionsgemisch hinzugefügt.

Die Transfektionsansätze wurden in Polysterengefäßen nach folgendem Protokoll vorbereitet:

Tabelle 18: Ansatz pro siRNA für 1 ml Endvolumen

1. Ansatz	2. Ansatz
98µl FBS-freies DMEM	98µl FBS-freies DMEM
+ 1,5µl SiLentFect	+ 2µl siRNA bzw. Kontroll-siRNA [Endkonzentration: 20µM]

Die Ansätze wurden jeweils 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit einer Pipette vermischt. Diese Mischung wurde erneut 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie mit 800µl FBS-DMEM vermischt und zu den Zellen gegeben wurde. Innerhalb der 20-minütigen Inkubationszeit bildet das siLentFect einen Komplex mit der jeweiligen siRNA, der später die Aufnahme durch die Zellen vermittelt.

Für ein optimales Wachstum der Zellen erfolgte die Inkubation im Brutschrank. Um überschüssiges Transfektionsreagenz vollständig zu entfernen, wurde 16 Stunden nach der Transfektion das Medium gewechselt.

### 3.1.4 Viabilitätsassay

Viabilitätsassays (MTT-Assays) ermöglichen eine sensitive Messung der Zellviabilität. Hierzu wurden in eine 12-Loch-Zellkulturplatte pro Loch  $2,4 \times 10^4$  Zellen ausgesät und die entsprechenden siRNAs nach oben beschriebenem Protokoll trans-



fiziert. 72 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium abgesaugt und je Loch durch 200µl MTT-Medium ersetzt.

Dieses war wie folgt zusammengesetzt:

MTT-Reagenz: 5mg Thiazolylblau (MTT) in 1ml PBS gelöst

MTT-Medium: 12ml FBS-freies DMEM + 1ml MTT-Reagenz.

MTT ist ein Tetrazoliumsalz, welches als gelber Farbstoff sichtbar ist. Es wird durch NADPH-abhängige Enzyme im endoplasmatischen Retikulum der Zellen zu dem blauen Farbstoff Formazan reduziert. Dementsprechend korreliert die Glykolyserate der Zellen mit der Menge an umgesetztem Farbstoff, welche im MTT-Assay als Farbumschlag von gelb zu blau sichtbar wird.

Nach zweistündiger Inkubation im Brutschrank hatten die Zellen den Farbstoff entsprechend ihrer Stoffwechselaktivität umgesetzt. Nun wurde das MTT-Medium abgesaugt und die Zellen mittels 200µl Solubilization Solution (10% Triton X 100 und 0,1M HCl in Isopropanol) aufgelöst, wodurch der Farbstoff freigesetzt wurde.

Die gefärbte Lösung wurde je nach Farbintensität mit PBS verdünnt und anschließend mittels Photometer Multiskan FC bei 595nm gemessen.

### 3.1.5 Proliferationsassay

Zusätzlich zur Anzahl der lebenden Zellen sollte deren Proliferation bestimmt werden. Hierzu wurde mithilfe des „Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescent)“-Kit ein BrdU-Assay durchgeführt.

Hierfür wurden  $2,4 \times 10^3$  Zellen je Loch einer ViewPlate-96 Black ausgesät und nach Protokoll transfiziert. Pro Probe wurde die Proliferation in je drei Vertiefungen gemessen, während die vierte Vertiefung zur Messung der Hintergrundaktivität diente. Nach 48 Stunden Inkubation im Brutschrank wurde das Medium abgesaugt und durch 100µl BrdU-haltiges FBS-DMEM („Labelingsolution“) ersetzt. Bromdesoxyuridin (BrdU) ist ein Pyrimidinanalogon, welches bei Neusynthese der DNA in der S-Phase anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut wird. Nach 6-stündiger Inkubation im Brutschrank wurde je Loch 200µl „Fix Denate“ auf die Zellen gegeben und nach einer Stunde wieder abgenommen. Mittels „Fix Denate“ werden die Zellen sowohl fixiert als auch lysiert, sodass die DNA frei zugänglich wird. Dies ermöglicht den Antikörpern, die als nächstes auf die Zellen gegeben

wurden („Anti-BrdU-POD workingsolution“), an die in die DNA eingebauten BrdUs zu binden. Nach erneuten 90 Minuten Inkubationszeit wurden die Zellen dreimal mit 200µl „Washingsolution“ gewaschen, um ungebundene Antikörper abzuspielen. Nun wurden 100µl „Substrate solution“ hinzugegeben. Dieses Substrat wird durch die an die Antikörper gebundene Peroxidase oxidiert, wodurch Chemolumineszenz entsteht. Das emittierte Licht (rLE/s) wurde innerhalb der nächsten zehn Minuten im Luminometer Centro LB 960 erfasst. Die Lichteinheiten pro Sekunde korrelieren dabei mit der Menge an neu synthetisierter DNA und somit mit der Proliferationsaktivität der Zellen.

### 3.1.6 Zellzyklusanalysen

Um in Zellpopulationen die prozentuale Verteilung von Zellen in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus zu analysieren, wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Hierfür wurden zwei 6-Loch-Kulturplatten mit unterschiedlichen Zellzahlen besät, um zu unterschiedlichen Analysezeitpunkten eine Konfluenz von 80% gewährleisten zu können. Standardmäßig wurden Zellen 48h und 72h nach Transfektion analysiert. Für den 48-Stunden-Zeitpunkt wurden  $12,5 \times 10^4$  Zellen pro Loch und für den 72-Stunden-Zeitpunkt  $9 \times 10^4$  Zellen pro Loch ausgesät. Die Zellen wurden nach Protokoll transfiziert.

Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden die Zellen abgenommen und bei 1500 UpM für drei Minuten zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit 500µl kaltem PBS gewaschen, in ein FACS-Röhrchen überführt und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 50µl kaltem PBS resuspendiert. Nun wurde unter konstanter Durchmischung (Vortex) 1ml eiskalte 70%ige Ethanolösung zu der Suspension geträufelt. Nach 24-stündiger Inkubation bei 4°C waren die Zellen fixiert. Nun wurde die Lösung erneut bei 1500 UpM drei Minuten zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und die Zellen dreimal mit 500µl eiskaltem PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurde die Färbung der Zellen vorgenommen. Hierfür wurden die Zellen in 500µl einer „Violet Stain“-Lösung (Endkonzentration 1ng/µl in PBS) verteilt. Bei Raumtemperatur und im Dunkeln wurden die Zellen für 45 Minuten in der Lösung belassen. In dieser Zeit lagert sich der fluoreszierende Farbstoff an die DNA der Zellen an. Diese färben sich folglich je nach Zellzyklusprogression und entsprechendem DNA-Gehalt unterschiedlich stark an. Im An-

schluss wurde die Fluoreszenz jeder einzelnen Zelle im Durchflusszytometer LSR II mit dem violetten Laser bei einer Wellenlänge von 405nm und einem Bandpass Filter von 440/40nm gemessen und die Zellen ihrer Fluoreszenz entsprechend den jeweiligen Zellzyklusphasen (G1-, S- und G2-Phase) zugeordnet. Für die Auswertung der ermittelten Daten wurde die Software FlowJo verwendet.

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 RNA-Isolation

Zur Überprüfung der Expression des zu untersuchenden Gens wurde die RNA 48 Stunden nach der Transfektion mithilfe des „peqGOLD Total RNA Kit“ aus den Zellen isoliert. Dieser Vorgang wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen durch Zugabe von Lysepuffer aufgebrochen sowie die vorhandenen Enzyme (vor allem RNAsen) inhibiert. Anschließend wurde das Lysat mittels Zentrifugation durch eine Shredder-Säule homogenisiert. Der Durchfluss wurde mit 70%igem Ethanol vermischt, um die enthaltene RNA zu fällen. Das Gemisch wurde auf eine HiBind® RNA-Säule gegeben. RNA ab einer Länge von 200 Nukleotiden konnte nun an die in der Säule enthaltene Silikonmembran binden. Verbliebene Proteine, DNA und Kontaminationen wurden hingegen durch mehrere Waschvorgänge abzentrifugiert und verworfen. Abschließend wurde die gereinigte RNA für zwei Minuten trocken zentrifugiert und mit sterilem, RNase-freiem Wasser eluiert. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

### 3.2.2 cDNA-Synthese

Im Anschluss an die RNA-Isolation wurde aus der gewonnenen RNA cDNA synthetisiert.

Zunächst wurde die Konzentration der isolierten RNA mit dem Nanodrop ND-1000 gemessen. Zur Durchführung der PCR wurde mithilfe des „Omniscript Reverse Transcription Kit“ jeweils 1µg RNA in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde die notwendige Menge an RNA mit RNase-freiem Wasser auf 14,1µl aufgefüllt und je 5,9µl des Mastermix hinzugefügt. Die Zusammensetzung des Mastermixes war wie folgt:

Tabelle 19: Mastermix für die cDNA-Synthese

Mastermix:	je Probe	}	<div>Endvolumen: 20µl</div> <div>5,9µl Mastermix +</div> <div>14,1µl RNA in Wasser</div>
H <sub>2</sub> O dd	1µl		
Reverse Transkriptase	0,5µl		
dNTP Mix (5mM)	2µl		
10x Puffer	2µl		
Oligo-dT Primer (100µM)	0,4µl		

Der Reaktionsansatz wurde nun für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach der Synthese erfolgte die Lagerung der cDNA bei -20°C.

### 3.2.3 Quantitative RealTime-PCR

Bei der qRT-PCR werden durch Bindung spezifischer Primer bestimmte Teile der cDNA mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion vervielfacht. Hierzu wurde nach dem folgenden Protokoll ein Mastermix angesetzt und mit der neusynthetisierten cDNA vermischt:

Tabelle 20: Mastermix für die qRT-PCR

Mastermix	je Probe	}	<div>Endvolumen: 20µl</div> <div>19µl Mastermix +</div> <div>1µl cDNA (1:10 verdünnt)</div>
SYBR® Green PCR Master Mix	10µl		
Primer forward (10pmol)	0,2µl		
Primer reverse (10pmol)	0,2µl		
H <sub>2</sub> O dd.	8,6µl		

Der hinzugefügte SYBR® Green PCR Master Mix ist eine Pufferlösung, die den Farbstoff SYBR Green I enthält. Zudem sind ihm sowohl die AmpliTaq Gold® DNA Polymerase als auch Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP) beigelegt, die für die Herstellung der neuen DNA-Stränge notwendig sind.

Die PCR selbst lief in drei Schritten ab: der Aktivierungsphase, der Amplifikationsphase sowie der Schmelzkurvenanalyse.

Zunächst erfolgte die Aktivierungsphase bei 95°C. In dieser Phase werden sowohl noch enthaltene Enzyme, als auch die in der DNA enthaltenen Wasserstoffbrückenbindungen denaturiert. Die Taq-DNA-Polymerase hingegen wird erst durch die hohen Temperaturen aktiviert. Bei Raumtemperatur hat die Polymerase hitzelabile, aktivitätsblockierende Gruppen gebunden, die bei 95°C zerstört werden, wodurch das Enzym entblockt wird.

Im Anschluss folgte die Amplifikationsphase, in der innerhalb von 40 Zyklen die genspezifische cDNA vervielfältigt wird. Jeder dieser 40 Zyklen unterteilt sich

wiederum in drei Phasen. In der ersten Phase, der Denaturierungsphase, wird die doppelsträngige DNA bei erneuter Erhitzung auf 95°C in zwei Einzelstränge getrennt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch auf 60°C abgekühlt, wodurch sich die im Mastermix enthaltenen Primer an die passende Stelle des DNA-Einzelstrangs anlagern können (Annealing). In der anschließenden Verlängerungsphase lagert sich die Taq-DNA-Polymerase an die gebundenen Primer an und beginnt unter Benutzung der beigefügten dNTP die Synthese des komplementären DNA-Strangs.

SYBR Green I absorbiert grünes Licht bei einer Wellenlänge von 521nm. Während der Amplifikation lagert sich der Farbstoff in die neu synthetisierte doppelsträngige DNA (dsDNA) ein, wodurch die Intensität des Fluoreszenzsignals zunimmt. Die Zunahme der Fluoreszenz ist somit direkt proportional zur Anzahl der neusynthetisierten dsDNA-Stränge. Das emittierte Fluoreszenzsignal wird in jedem Zyklus nach der Annealing-Phase von der im 7500 Fast Real-Time PCR System enthaltenen Kamera registriert, von der Software ausgewertet und in einen Kurvenverlauf eingetragen. Hierdurch wird zeitgleich zur Amplifikation der DNA eine Quantifizierung der DNA-Menge in Echtzeit möglich, daher der Name „RealTime-PCR“. Im Laufe der Amplifikation entsteht somit eine exponentielle Kurve, welche die Menge an amplifizierter DNA darstellt.

Da bei der Bindung des SYBR Greens keine Sequenzspezifität besteht, wurde im Anschluss an jede PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Hierbei wird die Temperatur langsam in Schritten von 0,2°C auf 95°C erhöht und auf jeder Stufe die Fluoreszenz gemessen. Die Temperaturerhöhung führt zu einem Aufschmelzen des DNA-Doppelstrangs, der Doppelstrang denaturiert in zwei Einzelstränge. Die Temperatur, bei der die Denaturierung stattfindet, ist abhängig von der Länge und Basenzusammensetzung des DNA-Fragmentes. Liegen 50% der Fragmente doppelsträngig und 50% einzelsträngig vor, ist die fragmentspezifische Schmelztemperatur erreicht. Durch die Denaturierung wird das eingelagerte SYBR Green freigesetzt; die Abnahme der Fluoreszenz wird registriert und verwertet. Die entstehende Schmelzkurve ermöglicht es, zu kontrollieren, ob in jeder PCR-Reaktion jeweils nur ein spezifisches Produkt entstanden ist.

Zur Normalisierung der PCR-Ergebnisse wurde zusätzlich mittels spezifischer Primer die cDNA für das Gen RPLP0 amplifiziert. Dieses „Haushaltsgen“ wird in allen Pankreaszellen ubiquitär exprimiert und kaum reguliert. Um eine relative Quan-

tifizierung der Zielgen-Expression zu erhalten, wurde die Expression des Zielgens mit der des Haushaltsgens ins Verhältnis gesetzt. Diese Art der Quantifizierung reduziert den Einfluss möglicher Fehlerquellen auf das Expressionsergebnis. Dementsprechend ermöglicht die relative Quantifizierung einen Vergleich der relativen Expressionsergebnisse in voneinander unabhängigen Versuchsdurchläufen.

Um eine Verunreinigung der Proben und damit eine mögliche Fehlerquelle auszuschließen, wurde für alle analysierten Gene eine Wasserkontrolle mitgeführt. Hierbei wurde das für die cDNA-Synthese sowie für die Mastermixherstellung verwendete sterile Wasser anstelle der cDNA mit dem Mastermix versetzt und in die PCR-Platte pipettiert. Zeigte die Negativkontrolle eine Zunahme der Fluoreszenz und somit eine Amplifikation von DNA, konnte von einer Verunreinigung ausgegangen werden und das Ergebnis wurde verworfen.

### 3.3 Immunologische Methoden (Western Blot-Analysen)

#### 3.3.1 Vorbereitung der Lysate

In 6cm-Schalen wurden je Ansatz circa  $2 \times 10^5$  Zellen ausgesät und nach Protokoll transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit einem Zellschaber geerntet und mitsamt Medium in ein Falcon überführt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 16000 UpM wurden die erhaltenen Zellpellets mit 1ml PBS resuspendiert und die Suspension in 1,5ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Nach erneuter fünfminütiger Zentrifugation bei 13000 UpM fand die Behandlung der Zellen statt. Hierfür wurden die erhaltenen Zellpellets größenabhängig in circa 100µl eines Mastermix (Rezept wie folgt) resuspendiert und anschließend auf Eis gelagert:

Tabelle 21: Mastermix zur Proteinlysatherstellung (Endvolumen: 1ml)

<b>Mastermix</b>	
EDTA 0,5M	1µl
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 100mM	20µl
PMSF 100mM	10µl
Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> * 10 H <sub>2</sub> O 100mM	25µl
NaF 1M	50µl
PBS 1x	884µl
Protease Arrest 100x	10µl

Diese Suspension wurde nun mit einer Ultraschall-Sonde beschallt. Hierdurch wurden die Zellen mechanisch zerstört und die enthaltenen Proteine freigesetzt.

Die anschließende Quantifizierung der Proteinkonzentration wurde nach der Bradford-Methode durchgeführt. Hierzu wurde in eine 96-Loch-Platte 150µl Coomassie Plus Protein Assay Reagent pipettiert, je 2µl der Probe hinzugefügt und eine Inkubationszeit von 5 Minuten abgewartet. In dieser Zeit bildet der Farbstoff „Coomassie Plus Protein Assay Reagent“ Komplexe mit den in der Probe enthaltenen Proteinen, wodurch sich sein Absorptionsmaximum von 465nm auf 595nm verschiebt. Je nach Proteinkonzentration der zugefügten Proben nahm die Absorption unterschiedlich stark zu, was in Form einer Blaufärbung sichtbar wurde. Diese Veränderung in der Absorption konnte anschließend im Photometer Multiskan FC bei 595nm gemessen werden. Mit Hilfe von sechs definierten Konzentrationen an Kälberserumalbumin wurde parallel eine Eichgerade erstellt, welche in der Folge als Standard diente. Mittels dieser Eichgeraden konnten im Anschluss an die Messung die Proteinkonzentrationen der Proben errechnet werden. Die fertigen Zelllysate wurden bei -20°C gelagert.

### 3.3.2 SDS-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der extrahierten Proteine nach ihrer Größe wurde die SDS-PAGE-Methode verwendet (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese). Hierbei wandern die Proteine abhängig von ihrer Größe unterschiedlich schnell durch ein Polyacrylamid-Gel, an das eine Spannung angelegt wird.

Je nach Größe der nachzuweisenden Proteine wurden Gele mit 10%, 12% oder 15% Acrylamidgehalt verwendet, die jeweils aus Trenngel und Sammelgel bestanden. Das Trenngel wurde nach dem in Kapitel 2.8.1 genannten Rezept gegossen. Für zwei Gele wurden 500µl der Trenngel-Lösung in ein 1,5ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und mit 2,5µl 10%igem APS sowie 2,5µl TEMED versetzt. Diese „Stopplösung“ wurde als erstes zwischen die Glasplatten pipettiert, polymerisierte binnen Sekunden am Grund der Form und verhinderte so das Auslaufen des restlichen Gels. Im nächsten Schritt wurden 5ml des Trenngels ein- und die Form schließlich mit 2ml des Sammelgels aufgefüllt. Dieses setzte sich für zwei Gele aus 4ml der bei 4°C gelagerten Sammelgellösung (Rezept siehe Kapitel 2.8.2) und 10µl 10%igem APS sowie 10µl TEMED zusammen.

Nach ungefähr 45 Minuten waren die Gele polymerisiert und konnten in die Gelkammer eingebaut werden. Diese wurde mit SDS-Laufpuffer (Rezept siehe Kapitel 2.9) aufgefüllt.

Um die Proteine nach ihrer Größe aufteilen zu können, mussten sie zunächst entfaltet und ihre Eigenladung maskiert werden. Die enthaltenen Disulfidbrücken wurden durch Zugabe von 7  $\mu$ l DTT zu 50  $\mu$ l der Probe gespalten. Zusätzlich wurden 16  $\mu$ l 4x-SDS-Probenpuffer (Rezept siehe Kapitel 2.9) hinzugefügt. Das SDS lagert sich an die Proteine an und sorgt so für eine gleichmäßig negative Ladung. Hierdurch wandern die Proteine im Gel von der Kathode zur Anode und die Geschwindigkeit bleibt unabhängig von der individuellen Ladung eines Proteins. Anschließend wurde die Quartärstruktur der Proteine durch fünfminütiges Erhitzen auf 95°C aufgebrochen.

Nun konnten die Taschen der Polyacrylamid-Gele beladen werden. In die äußerste Tasche wurde zunächst 5  $\mu$ l eines PageRulers pipettiert. Dieses läuft mit den Proteinen durch das Gel und trennt sich der Größe nach farblich auf. Dementsprechend kann später zugeordnet werden, an welcher Stelle des Gels welche Proteingröße zu finden ist. Anschließend wurden je 10  $\mu$ g der einzelnen Proben in die restlichen Taschen gefüllt.

Zunächst durchliefen die Proben bei einer Spannung von 120V das Sammelgel, in dem sie zu einer scharfen Bande zusammenliefen. Erst im Trenngel findet die eigentliche Auftrennung der Proteine statt. Hatten die Banden das Trenngel erreicht, wurde die Spannung auf 160V gestellt, um die Laufgeschwindigkeit zu erhöhen. Sobald sich die Proteine ausreichend aufgetrennt hatten, wurde der Stromfluss abgestellt und die Gele mitsamt den geladenen Proteinen aus der Gelkammer herausgenommen.

### 3.3.3 Transfer von Proteinen

Um die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine mit einem Antikörper detektieren zu können, mussten sie zunächst auf eine Nitrocellulosemembran transferiert werden. Dies geschah mittels Tank-Blot-Verfahren. Hierzu wurde das Gel auf eine Nitrocellulosemembran gelegt, mit Filterpapier ummantelt und mithilfe von Schwämmen fest in ein Sieb eingespannt. Die Blotting-Apparatur wurde mit Blotting Puffer (Rezept siehe Kapitel 2.9) aufgefüllt und ein elektrisches Feld mit einer Spannung von 300mA angeschlossen. Das elektrische Feld steht hier senkrecht zu



dem der SDS-PAGE und veranlasst so die Proteine dazu, aus dem Gel in die angelegte Nitrocellulosemembran zu wandern. Je nach Proteingröße musste zwischen 30 und 75 Minuten geblottet werden, wobei Proteingewicht und Blotting-Zeit miteinander korrelieren.

Um den Erfolg des Proteintransfers zu überprüfen, wurde die Membran im Anschluss für einige Minuten in eine Ponceau-S-Lösung gelegt. Diese färbt die Proteine auf der Membran an. Das Ergebnis wurde eingescannt und die Ponceau-Färbung mithilfe von TBS-T (TBS (Rezept siehe Kapitel 2.9) versetzt mit 0,1% Tween 20) wieder abgespült.

### 3.3.4 Immunoblotting

Um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern, wurde die Membran nun für 2-4 Stunden auf dem Kippschüttler bei 4°C mit 5%iger Milch (Milchpulver gelöst in TBS-T) geblockt.

Da bei dem verwendeten BCKDK-Antikörper tendenziell viele unspezifische Bindungen auftraten, wurde die entsprechende Membran für den Nachweis der BCKDK grundsätzlich mit Triton X 100 statt mit TBS-T gewaschen. Ebenso wurde hier die Milch mit Triton X 100 anstelle von TBS-T angesetzt.

Nachdem die Membran ausreichend geblockt worden war, wurden die jeweiligen Erstantikörper (siehe Kapitel 2.10.1) gegen die zu bestimmenden Proteine auf die Membran pipettiert und über Nacht (circa 12 Stunden) bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Die Antikörper wurden in Verdünnungen von 1:1000 bis 1:500 in 5%iger Milch (Milchpulver gelöst in TBS-T) angesetzt und bei -20°C aufbewahrt.

Am nächsten Morgen wurde die Membran dreimal für jeweils 10 Minuten mit TBS-T gewaschen, um ungebundene Antikörperreste zu entfernen. Im Anschluss wurde sie mit dem Zweitantikörper angefärbt. Dieser bestand je nach verwendetem Erstantikörper aus Anti-Maus-IgG oder Anti-Kaninchen-IgG, an die eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war (siehe Kapitel 2.10.2). Die Zweitantikörper wurden in einer Verdünnung von 1:10000 in 5%iger Milch immer frisch angesetzt. Nach einer einstündigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Membran wie zuvor dreimal für jeweils 10 Minuten mit TBS-T gewaschen. Je nach Stärke der Antikörperbindung wurde nun ECL-Plus oder ECL-Ultra auf die Membran pipettiert und für etwa 30 Sekunden darauf belassen. Das ECL wurde von der Peroxidase

unter Freisetzung von Lichtsignalen umgesetzt und mit Hilfe der Chemocam als Detektionssystem aufgezeichnet und quantifiziert.

Um die Proteinladung der einzelnen Gelspuren zu überprüfen, wurde nach erneutem Waschen ein Aktin-Antikörper auf die Membran gegeben. Dieser wurde zwei Stunden auf einem Schüttler bei 4°C inkubiert, bevor die Membran gewaschen, mit ECL-Plus betröpfelt und mittels Chemocam ausgewertet werden konnte. Die nun sichtbare Bande diente als Maßstab für die Menge an geladenem Protein. Im Rahmen der Auswertung wurde die Expression der jeweiligen Proteine ins Verhältnis zu dieser Kontrolle gesetzt.

### **3.4 Statistische Auswertung**

Allen Ergebnissen liegen mindestens drei unabhängig reproduzierte Experimente zugrunde. Aus allen numerischen Ergebnissen wurden die Mittelwerte gebildet und die dazugehörigen Standardabweichungen berechnet.

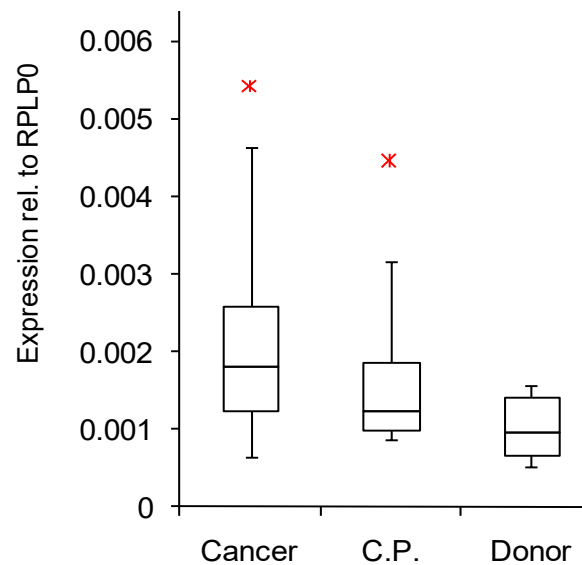
Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels eines einseitigen, ungepaarten Student's t-Test. Dabei wurde ein Wert von  $p < 0,05$  als signifikant und ein Wert von  $p < 0,01$  als hochsignifikant gewertet.

## 4. Ergebnisse

Die Einzelcharakterisierung des BCKDK-Gens sollte seinen Einfluss auf das Zellwachstum und die Proliferation zeigen. Hierfür wurden in verschiedenen Zelllinien Repressionsanalysen durchgeführt und die Effekte mittels funktioneller sowie mechanistischer Analysen untersucht.

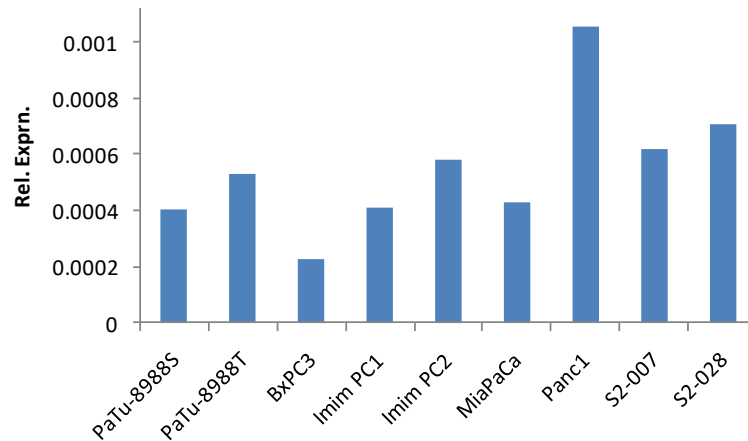
### 4.1 Expression von BCKDK im Pankreasgewebe

In Vorversuchen der Arbeitsgruppe wurde die Expression von BCKDK auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR untersucht. Hierbei wurde die verwendete mRNA aus gesundem sowie erkranktem humanem Pankreasgewebe gewonnen. Es zeigte sich eine leichte Zunahme der relativen BCKDK-Expression im Pankreaskarzinomgewebe im Vergleich zu gesundem Pankreasgewebe sowie der chronischen Pankreatitis (Abb. 8). Zudem war die Expression von BCKDK-mRNA in allen untersuchten Zelllinien des Pankreaskarzinoms nachweisbar, wobei die relative Expression in den Panc-1-Zellen leicht über dem Niveau der anderen Zelllinien lag (Abb. 9).



**Abbildung 8: BCKDK-Expression in verschiedenen Geweben des Pankreas.**

Darstellung der Expression von BCKDK auf mRNA-Ebene im Vergleich zum Haushaltsgen RPLP0 (qRT-PCR). Dargestellt sind der Median, das obere sowie untere Quartil und die Maximal- bzw. Minimalwerte innerhalb des 1,5-fachen Interquartilsabstandes. Cancer = Pankreaskarzinomgewebe (n=12), C.P. = Chronische Pankreatitis (n=5), Donor = Gesundes Pankreasgewebe (n=8), <sup>x</sup> = Outliers.



**Abbildung 9: BCKDK-Expression in verschiedenen Zelllinien des PDAC.**

Darstellung der Expression von BCKDK auf mRNA-Ebene im Vergleich zum Haushaltsgen RPLP0 (qRT-PCR).

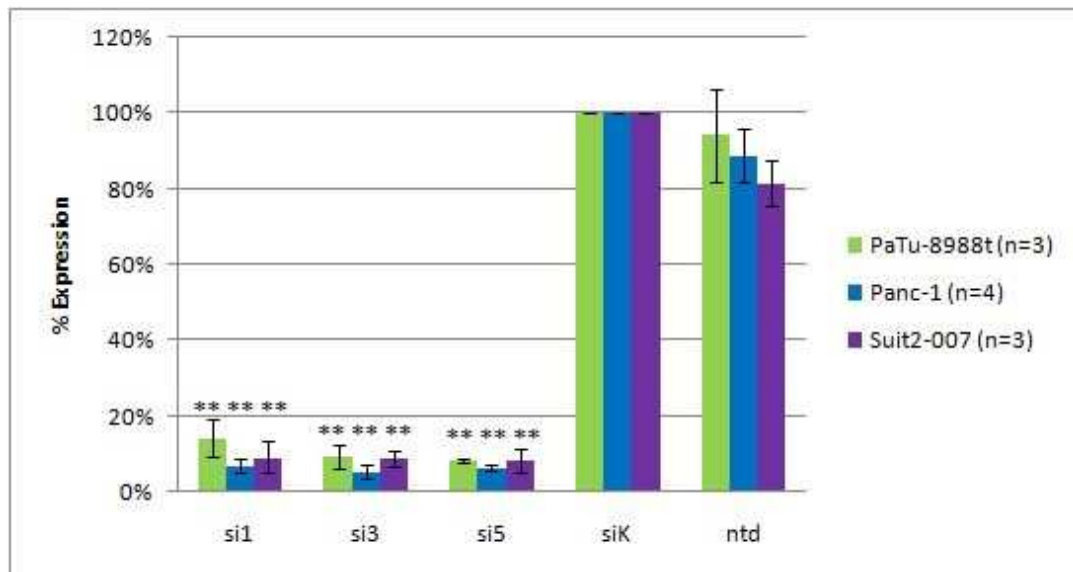
Basierend auf diesen Vorversuchen wurden drei Zelllinien des Pankreaskarzinoms ausgesucht, um die weitere Charakterisierung der BCKDK mit ihnen durchzuführen. Eine dieser Zelllinien waren die Panc-1-Zellen, mit denen bereits das Kinomewide Screening durchgeführt worden war.

## 4.2 Repression der BCKDK-Expression

### 4.2.1 Repressionseffizienz auf mRNA-Ebene

Um die Transfektionseffizienz zu überprüfen, wurde zunächst auf mRNA-Ebene die BCKDK-Expression kontrolliert.

Die Messung der BCKDK-spezifischen mRNA mittels qRT-PCR zeigte, dass die Expression dieses Gens mit den verwendeten siRNAs in allen drei Zelllinien hochsignifikant ( $p < 0,01$ ) supprimiert werden konnte (Abb. 10). Es ergaben sich Repressionsraten von bis zu 90%.

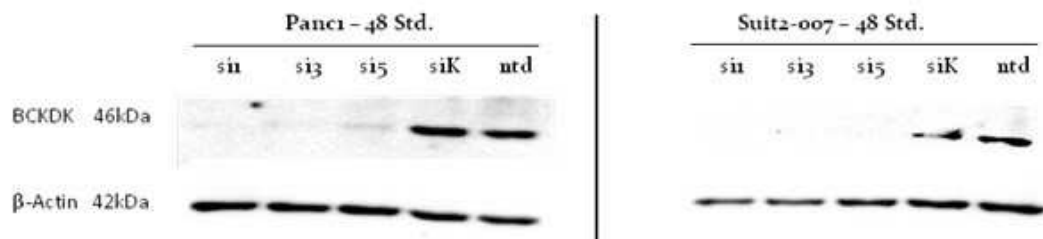


**Abbildung 10: SiRNA 1, 3 und 5 inhibieren die Translation von BCKDK effizient.**

Drei Zelllinien wurden mit verschiedenen siRNAs behandelt und ihre RNA nach 48-stündiger Inkubation isoliert. Für die qRT-PCR wurde 1µg der isolierten RNA in cDNA umgeschrieben. Die ermittelte BCKDK-Expression wurde auf die Expression des Haushaltgens RPLP0 normalisiert. Die Datenauswertung zeigt in den verwendeten Zelllinien für alle drei siRNAs eine hochsignifikante Effizienz ( $p < 0,01$ ) der Repression von ~90% im Vergleich zur non-silencing siRNA. Alle Versuche wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander reproduziert. PaTu-8988t: n=3; Panc-1: n=4; S2-007: n=3. Si1, 3, 5 = siRNA 1, 3 und 5; siK = non-silencing siRNA; ntd = unbehandelte Zellen. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung, die Signifikanz wurde mittels einseitigem Student's t-Test ermittelt; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ .

#### 4.2.2 Repressionseffizienz auf Protein-Ebene

Als nächstes wurde die Repressionseffizienz auf Protein-Ebene untersucht. Dies geschah durch immunologische Behandlung der gewonnenen Proteinlysate mit einem spezifischen BCKDK-Antikörper im Rahmen eines Western Blots. In drei voneinander unabhängig reproduzierten Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass das BCKDK-Signal nach Transfektion mit allen drei siRNAs deutlich geringer ausfiel als bei der Kontrollprobe (Abb. 11).



**Abbildung 11: SiRNA 1, 3 und 5 unterdrücken die Bildung der BCKDK in Panc-1 und S2-007-Zellen.**

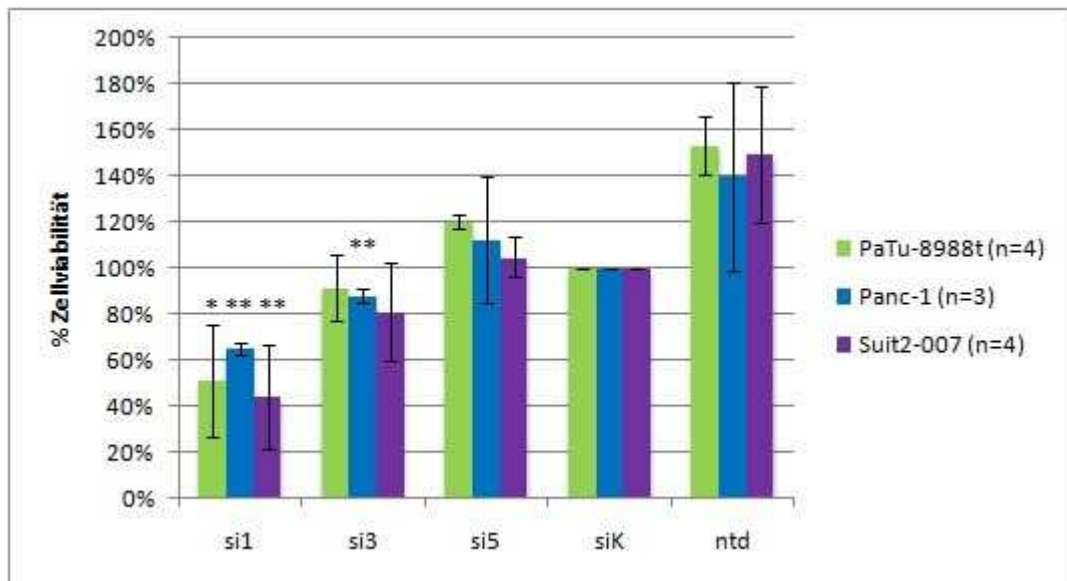
Die Proteinextrakte wurden 48 Stunden nach der Transfektion mit 3 verschiedenen siRNAs geerntet. Anschließend erfolgte der Nachweis mithilfe eines anti-BCKDK-Antikörpers (Verdünnung 1:1.000). Die Western Blot-Analysen zeigten eine gute Repressions-Effizienz für alle drei siRNAs. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot. N=3. Si1, 3, 5 = siRNA 1, 3 und 5; siK = non-silencing siRNA; ntd = unbehandelte Zellen.

## 4.3 Funktionelle Assays

### 4.3.1 MTT-Assay

Um den Einfluss der BCKDK-Suppression auf das Überleben der kultivierten Zellen zu untersuchen, wurden mit allen drei Zelllinien (Panc-1, PaTu-8988t, S2-007) MTT-Untersuchungen durchgeführt. Hierbei wurde 72 Stunden nach Transfektion der Anteil lebender Zellen bestimmt. In Abbildung 12 sind die Ergebnisse für die verschiedenen Zelllinien dargestellt.

In den einzelnen Experimenten zeigten sich abhängig von der verwendeten siRNA sehr unterschiedliche Effekte. Bei Verwendung der siRNA 1 war in allen drei Zelllinien ein deutlicher Effekt zu sehen: die Zellviabilität sank signifikant ( $p < 0,05$ ). Die siRNA 3 hatte einen schwächeren Effekt, der lediglich in den Zellen der Panc-1-Zelllinie signifikant ausfiel. Die Zellviabilität fiel hier auf rund 85%. Die siRNA 5 wiederum hatte keinen Effekt auf das Überleben der untersuchten Zelllinien.



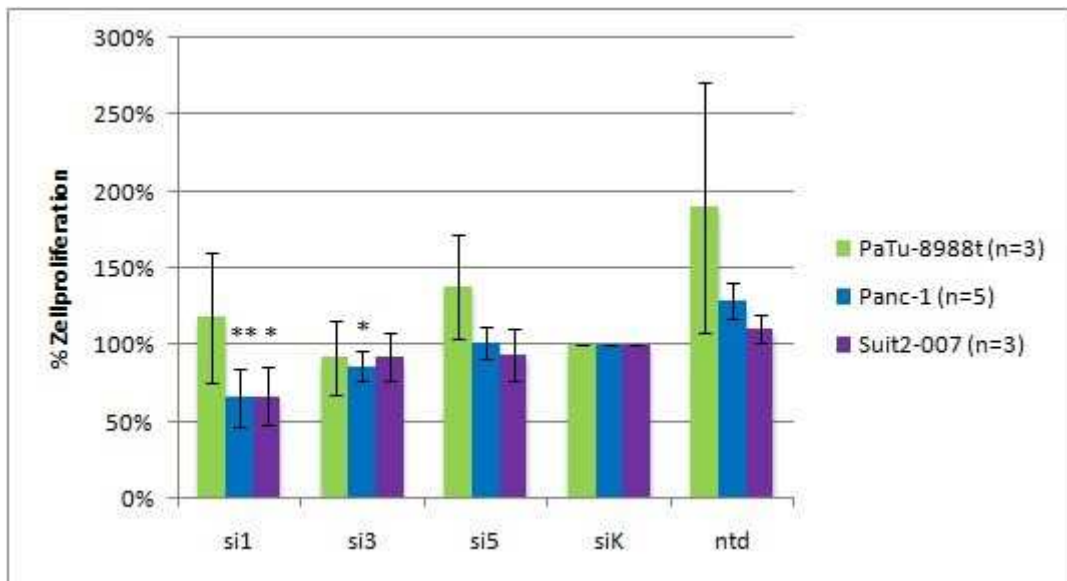
**Abbildung 12: SiRNA 1 verringert das Überleben der untersuchten Pankreaskarzinom-Zelllinien signifikant.**

72 Stunden nach der transienten Transfektion wurden MTT-Untersuchungen durchgeführt. Ein signifikanter Effekt zeigte sich bei der siRNA 1 in allen verwendeten Zelllinien sowie bei der siRNA 3 in den Panc-1-Zellen. Bei der siRNA 3 war in den anderen Zelllinien ein nicht-signifikanter Einfluss der BCKDK-Repression nachweisbar. Bei der siRNA 5 wurde kein Effekt beobachtet. Die Daten repräsentieren mindestens drei unabhängige Versuche. PaTu-8988t: n=4; Panc-1: n=3; S2-007: n=4. Si1, 3, 5 = siRNA 1, 3 und 5; siK = non-silencing siRNA; ntd = unbehandelte Zellen. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung, die Signifikanz wurde mittels einseitigem Student's t-Test ermittelt; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ .

### 4.3.2 BrdU-Assay

Die Untersuchung der Proliferation unter BCKDK-Repression erfolgte mittels BrdU-Assay. Die Ergebnisse für die jeweiligen Zelllinien und siRNAs sind in Abbildung 13 dargestellt.

Vergleichbar mit den Erkenntnissen aus den MTT-Versuchen variierten die Ergebnisse in Abhängigkeit von der verwendeten Zelllinie und siRNA. Eine signifikante Abnahme der Zellproliferation ( $p < 0,05$ ) wurde nur nach Transfektion der siRNA 1 in Panc-1- sowie S2-007-Zellen beobachtet. Des Weiteren verringerte die siRNA 3 die Proliferation in Panc-1-Zellen signifikant. Die Proliferation von PaTu-8988t-Zellen war durch keine der verwendeten siRNAs zu beeinflussen. Analog zum MTT (Abb. 12) zeigten die verwendeten Zelllinien keine Reaktion auf Transfektion der siRNA 5.



**Abbildung 13: SiRNA 1 verringert die Proliferationsrate von Panc-1- und S2-007-Zellen.**

48 Stunden nach Transfektion wurden mit drei Zelllinien BrdU-Untersuchungen durchgeführt. Ein signifikanter Effekt ( $p < 0,05$ ) konnte für die siRNA 1 und 3 in Panc-1-Zellen sowie für die siRNA 1 in S2-007-Zellen nachgewiesen werden. Die Daten repräsentieren mindestens drei voneinander unabhängige Versuche. PaTu-8988t:  $n=3$ ; Panc-1:  $n=5$ ; S2-007:  $n=3$ . Si1, 3, 5 = siRNA 1, 3 und 5; siK = non-silencing siRNA; ntd = unbehandelte Zellen. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung, die Signifikanz wurde mittels einseitigem Student's t-Test ermittelt; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ .

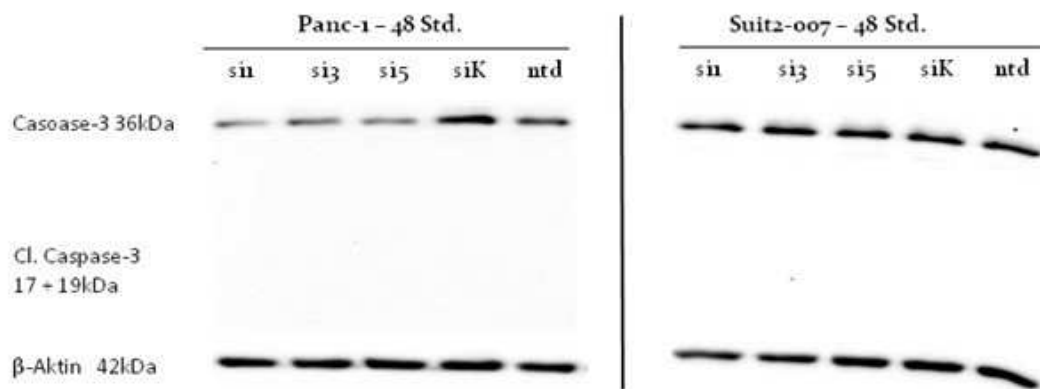
#### 4.3.3 Western Blot-Analysen

Neben der verminderten Zellproliferation kann eine gesteigerte Apoptoserate der Grund für die erniedrigte Zellviabilität sein. Um die apoptotischen Vorgänge innerhalb der Zellen genauer zu analysieren, wurden zwei Apoptose-Marker (Caspase-3 und PARP) und ihre Spaltprodukte mittels Western Blot untersucht.

In den zwei verwendeten Zelllinien wurde die Transfektion nach Protokoll durchgeführt, die Zellen nach 48-stündiger Inkubation lysiert und die gewonnenen Zelllysate für Western Blot-Analysen verwendet.

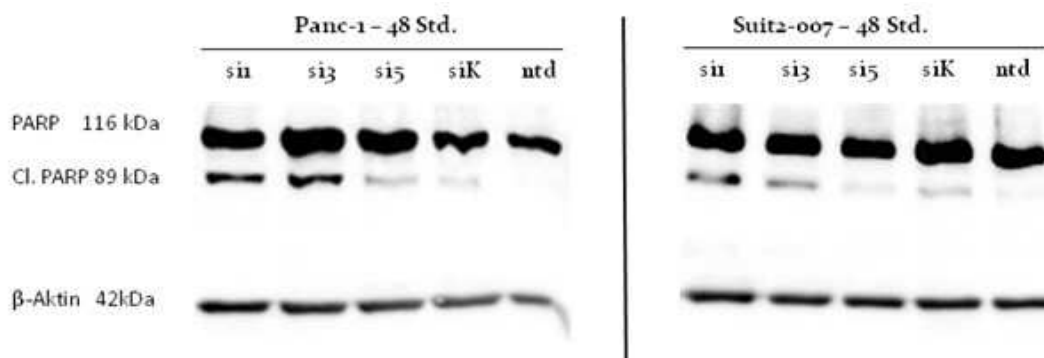
Bei vier reproduzierten Versuchen konnte keine Spaltung von Caspase-3 gezeigt werden (Abb. 14). Die Spaltung von PARP konnte hingegen in den mit den siRNAs 1 und 3 behandelten Versuchsproben nachgewiesen werden (Abb. 15). Im Gegensatz hierzu blieb die Spaltung bei Behandlung mit der siRNA 5 aus, es wurde also keine Apoptose initiiert.





**Abbildung 14: Keine Caspase-3-Spaltung nach Repression von BCKDK.**

48 Stunden nach der Transfektion wurden die Proteinextrakte aus den Zellen isoliert und im Western Blot mithilfe von Caspase-3- und cleaved Caspase-3-Antikörpern bezüglich ihrer Apoptose-Signale analysiert. Für beide Zelllinien zeigte sich, dass eine Repression von BCKDK nicht zu einer Spaltung von Caspase-3 führte. Eine Validierung der Ergebnisse erfolgte durch 4 unabhängige Experimente. Die Funktion der Antikörper wurde mithilfe einer Positivkontrolle überprüft. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot. N=4. Si1, 3, 5 = siRNA 1, 3 und 5; siK = non-silencing siRNA; ntd = unbehandelte Zellen.



**Abbildung 15: PARP-Spaltung nach Repression von BCKDK mithilfe von siRNA 1 und 3.**

48 Stunden nach der Transfektion wurden die Proteine aus den Zellen isoliert und im Western Blot mithilfe eines PARP-Antikörpers untersucht. Bei beiden Zelllinien führte die Transfektion mit den siRNA 1 und 3 zu einer Spaltung von PARP, während die Behandlung mit der siRNA 5 im Vergleich zur Kontrollprobe keine Unterschiede zeigte. Der dargestellte Western Blot wurde in vier unabhängigen Versuchen reproduziert. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot. N=4. Si1, 3, 5 = siRNA 1, 3 und 5; siK = non-silencing siRNA; ntd = unbehandelte Zellen.

## 4.4 Mechanistische Untersuchungen

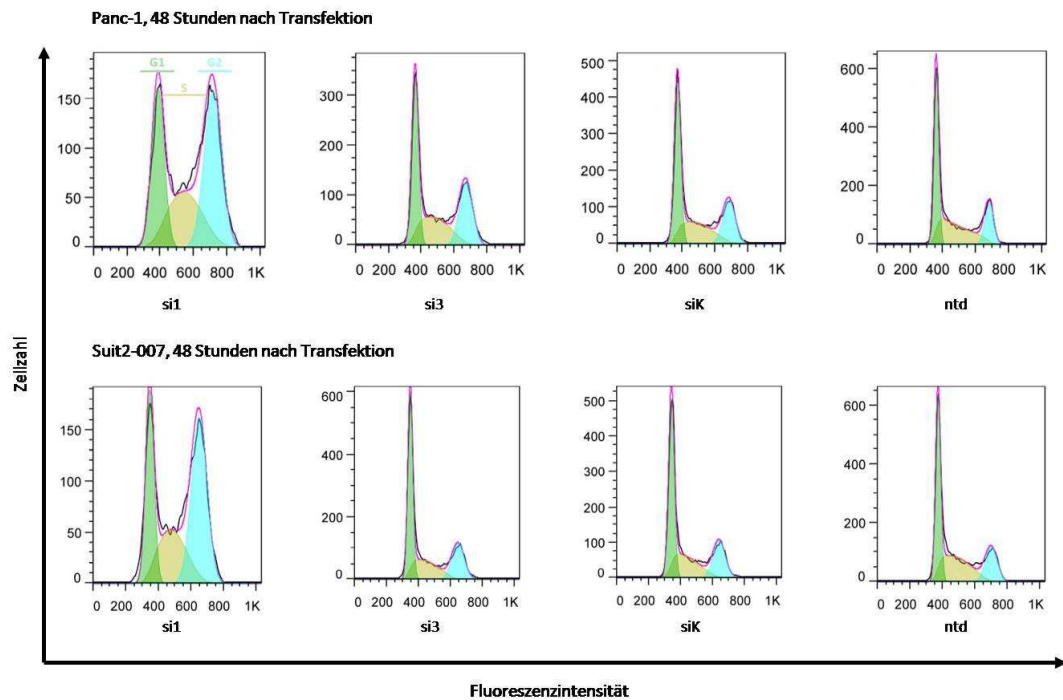
In den Vorversuchen konnte nach Transfektion von zwei der drei verwendeten siRNAs eine verminderte Zellproliferation gezeigt werden. Um ein genaueres Verständnis für die zellulären Mechanismen in den transfizierten Zellen zu erlangen, wurden Western Blot- sowie Zellzyklusanalysen durchgeführt.

### 4.4.1 Durchflusszytometrie

Um genauer zu bestimmen, in welcher Phase des Zellzyklus sich die Zellen befanden, wurden 48 Stunden und 72 Stunden nach Transfektion durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Die Untersuchungen beschränkten sich auf mit den siRNAs 1 und 3 transfizierte Zellen, da für die siRNA 5 bislang in keinem der Versuche ein nennenswerter Effekt der BCKDK-Repression nachgewiesen werden konnte.

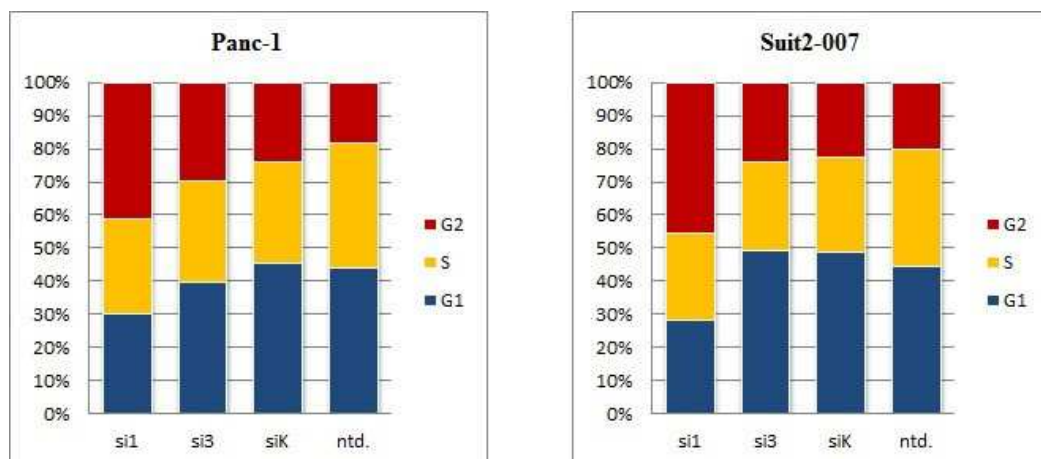
In den Abbildungen 16 und 17 sind repräsentative Ergebnisse einer durchflusszytometrischen Analyse von S2-007- sowie Panc-1-Zellen 48 Stunden nach Transfektion dargestellt. Abbildung 16 zeigt die resultierenden Histogramme beider Zelllinien, während Abbildung 17 die Verteilung der drei Zellzyklusphasen G1, S und G2 in den untersuchten Zellen darstellt.

Zu den untersuchten Zeitpunkten (48 Std. und 72 Std. nach Transfektion) war eine vergleichbare Verteilung zu beobachten. Nach Transfektion mit der siRNA 1 war in beiden Zelllinien ein G2/M-Phasen-Arrest zu erkennen. Der Anteil der Zellen in der G2-Phase stieg hier auf 45% im Vergleich zu 25% bei der Kontrolle an. Der Anteil der in der G1-Phase befindlichen Zellen sank unterdessen von 50% in den Kontrollproben auf nur 30% in den mit der siRNA 1 transfizierten Zellen. Der Anteil der Zellen in der Synthese-Phase blieb im Vergleich zur Kontrolle unverändert. Bei Transfektion der siRNA 3 konnte keine signifikante Veränderung der Zellzyklusstadien im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden.



**Abbildung 16: Durchflusszytometrische Analyse des Zellzyklus 48 Stunden nach Transfektion.**

Für beide Zelllinien konnte in der mit der siRNA 1 behandelten Probe eine Zunahme der Zellen beobachtet werden, die der G2-Phase zuzuordnen sind. Bei der siRNA 3 war hingegen im Vergleich zur Kontrolle sowie zu den unbehandelten Zellen kein Unterschied messbar. Gezeigt ist ein für beide Zelllinien repräsentatives Ergebnis. N=4. Si1, 3 = siRNA 1 und 3; siK = non-silencing siRNA; ntd = unbehandelte Zellen.

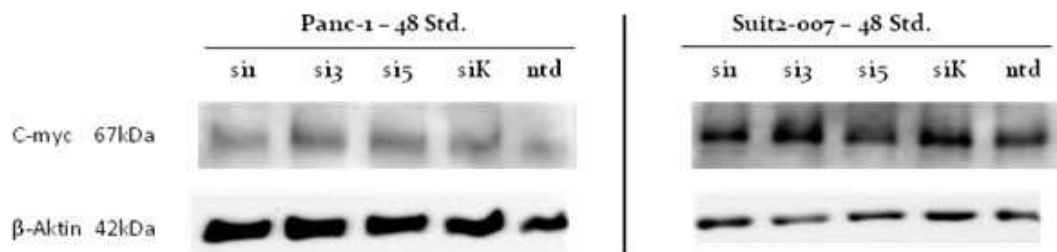


**Abbildung 17: Auswertung der Zellzyklusanalyse 48 Stunden nach Transfektion mittels Durchflusszytometrie.**

Die siRNA 1 führte in beiden Zelllinien zu einem G2/M-Phasen-Arrest. Die siRNA 3 hatte hingegen keinen signifikanten Einfluss auf den Zellzyklus. Gezeigt ist ein für beide Zeitpunkte repräsentatives Ergebnis. N=4. Si1, 3 = siRNA 1 und 3; siK = non-silencing siRNA; ntd = unbehandelte Zellen.

#### 4.4.2 Protoonkogen C-myc und Tumorsuppressor Retinoblastomprotein

Als Ursache für die verminderte Zellproliferation kommt eine Suppression des Transkriptionsfaktors C-myc in Frage. Um seine Bildung in den behandelten Zellen zu kontrollieren, wurden Western Blot-Analysen mit einem spezifischen Antikörper gegen C-myc durchgeführt. In keiner der Versuchsproben (n=2) konnte eine Änderung des C-myc-Gehalts der Zellen im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden (Abb. 18). In explorativen Versuchen mit Panc-1 (n=2) und S2-007 (n=5) wurde die Phosphorylierung und damit Inaktivierung des Retinoblastomproteins untersucht, das in der Zelle als Tumorsuppressor dient. Hierbei konnten jedoch keine systematischen, siRNA-abhängigen Veränderungen im Gehalt des pRB nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 18: Keine Veränderung im C-myc-Gehalt nach Repression von BCKDK.**

Nach Transfektion wurden die Zellen 48 Stunden inkubiert und im Anschluss lysiert. Mit den gewonnenen Proteinlysaten wurden Western Blot-Analysen mit einem spezifischen Antikörper gegen C-myc durchgeführt. In beiden Zelllinien war zu sehen, dass eine Repression von BCKDK nicht zu einer Veränderung des C-myc-Gehaltes in den Zellen führt. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot. N=2. Si1, 3, 5 = siRNA 1, 3 und 5; siK = non-silencing siRNA; ntd = unbehandelte Zellen.

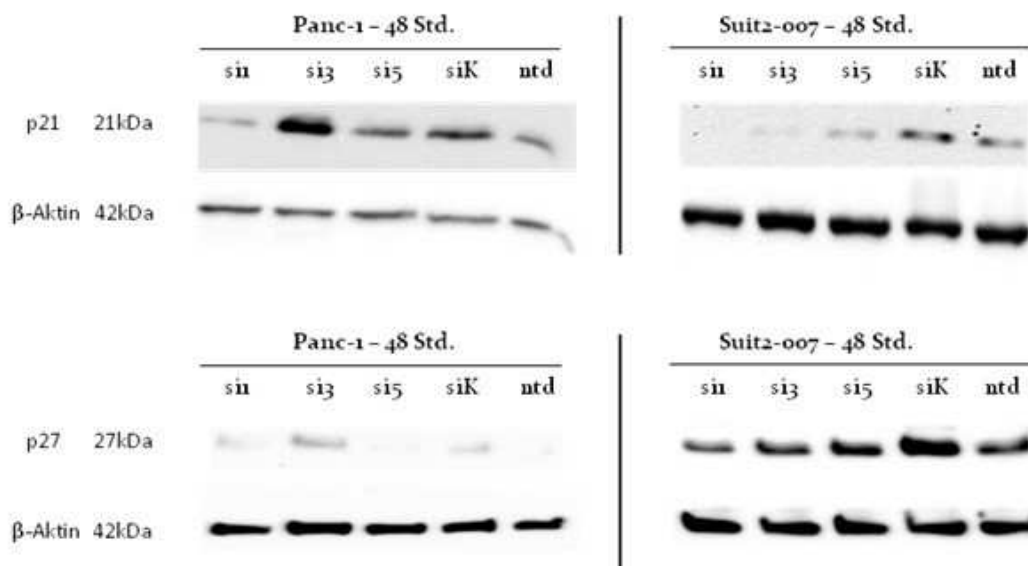
#### 4.4.3 CDK-Inhibitoren

In Western Blot-Analysen wurde die Bildung von p21<sup>Cip1/Waf1</sup> (CDK-Inhibitor 1) und p27<sup>Kip1</sup> (CDK-Inhibitor 1B) als übergeordnete Regulatoren des Zellzyklus mittels spezifischer Antikörper untersucht.

Abbildung 19 zeigt repräsentative Western Blots. In den Panc-1-Zellen war p27<sup>Kip1</sup> nur rudimentär vorhanden und nicht BCKDK-abhängig reguliert. In den S2-007-Zellen hingegen wurde es regulär exprimiert. Hier fiel auf, dass die Versuchsprobe, die mit der non-silencing siRNA behandelt worden war, ein verstärktes Signal für p27<sup>Kip1</sup> zeigte, während die mit den siRNAs 1, 3 und 5 behandelten Zellen ein niedriges Signalniveau beibehielten (vergleichbar mit dem Ergebnis für die unbehandel-

ten Zellen). Ein ähnliches Ergebnis fand sich bei der Untersuchung von  $p21^{\text{Cip1/Waf1}}$  in den S2-007-Zellen. Dieses Protein wurde im Gegensatz zum  $p27^{\text{Kip1}}$  zwar nur in rudimentären Mengen nachgewiesen, zeigte jedoch in den mit den siRNAs 1, 3 und 5 behandelten Versuchsproben ebenfalls eine Abnahme im Vergleich zur Kontrollprobe.

In den Panc-1-Zellen fiel eine starke Zunahme des  $p21^{\text{Cip1/Waf1}}$ -Gehalts in den mit der siRNA 3 behandelten Zellen auf. Die Versuchsproben, die mit der siRNA 1 behandelt worden waren, zeigten im Gegensatz hierzu eine schwächere Bande im Western Blot, was für einen verminderten  $p21^{\text{Cip1/Waf1}}$ -Gehalt spricht. In den Versuchen mit der siRNA 5 war im Vergleich zur Kontrollprobe kein Unterschied zu sehen.



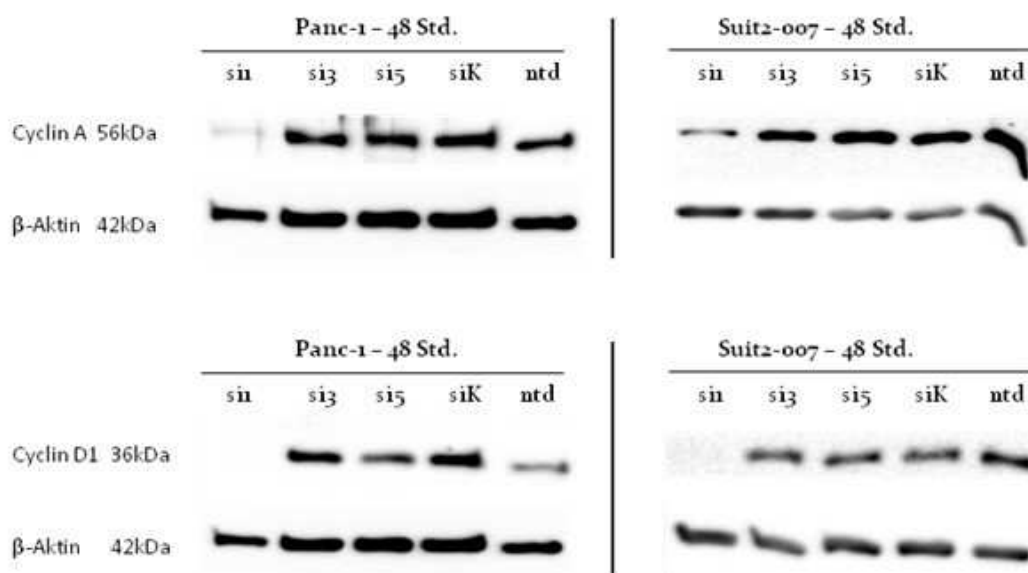
**Abbildung 19: Regulation von  $p21^{\text{Cip1/Waf1}}$  und  $p27^{\text{Kip1}}$  nach Repression von BCKDK.**

Nachdem die Zellen nach Protokoll behandelt und lysiert worden waren, wurden Western Blot-Analysen durchgeführt. Hierzu wurden Antikörper gegen  $p21^{\text{Cip1/Waf1}}$  sowie  $p27^{\text{Kip1}}$  verwendet. Die in drei unabhängigen Versuchen reproduzierten Western Blots zeigten abhängig von der Zelllinie und der verwendeten siRNA unterschiedliche Ergebnisse. In den Panc-1-Zellen wurde  $p27^{\text{Kip1}}$  nur rudimentär gebildet. In den S2-007-Zellen fiel für beide untersuchten Proteine für alle drei siRNAs eine verminderte Konzentration im Vergleich zu der Kontroll-siRNA auf. In den Panc-1 Zellen führte die Behandlung mit der siRNA 3 zu einem höheren, mit der siRNA 1 hingegen zu einem verminderten Gehalt an  $p21^{\text{Cip1/Waf1}}$ . Gezeigt ist ein repräsentativer Blot. N=3. P21 =  $p21^{\text{Cip1/Waf1}}$ ; p27 =  $p27^{\text{Kip1}}$ ; si1, 3, 5 = siRNA 1, 3 und 5; siK = non-silencing siRNA; ntd = unbehandelte Zellen.

#### 4.4.4 Cycline

Zusätzlich zu den übergeordneten Regulatoren des Zellzyklus sollte festgestellt werden, inwiefern Veränderungen in der BCKDK-Konzentration die Zellzyklusproteine direkt beeinflussen.

In Abbildung 20 sind die Ergebnisse dargestellt. Sie wurden in vier unabhängigen Versuchen validiert. Bei der Untersuchung von Cyclin A zeigte sich, dass die Ergebnisse abermals von der transfizierten siRNA abhängig waren. In beiden Zelllinien wurde Cyclin A in den mit der siRNA 1 behandelten Zellen vermindert gebildet, während die anderen Versuchsproben (siRNAs 3 und 5) keinen Effekt zeigten. Ein vergleichbares Bild zeigte sich in beiden Zelllinien für Cyclin D1. Zusätzlich zur siRNA 1 bewirkte auch die Repression von BCKDK mit der siRNA 5 in den Panc-1-Zellen eine leichte Suppression von Cyclin D1.



**Abbildung 20: SiRNA 1 supprimiert die Bildung von Cyclin A und Cyclin D1 in Panc-1- und S2-007-Zellen.**

In den Western Blot-Analysen wurden spezifische Antikörper gegen Cyclin A und Cyclin D1 verwendet. In beiden Zelllinien zeigte sich für beide Proteine eine Verminderung der Konzentration nach Transfektion mit der siRNA 1. Die anderen verwendeten siRNAs (3 und 5) hatten keine Effekte auf die untersuchten Proteine. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot. N=3. Si1, 3, 5 = siRNA 1, 3 und 5; siK = non-silencing siRNA; ntd = unbehandelte Zellen.

## 5. Diskussion

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas ist eine der tödlichsten Krebserkrankungen in den Industriestaaten (RKI und Krebsregister in Deutschland, 2015). Es zeichnet sich durch seine späte Diagnose, seine Therapieresistenz und seine schlechte Prognose aus. Trotz intensiver Forschung konnten bisher weder die zugrundeliegenden Pathomechanismen vollständig verstanden noch die Prognose des Pankreaskarzinoms verbessert werden.

In den letzten Jahren wurden verschiedene Gene identifiziert, die potenziell eine Rolle in der Entstehung und dem Wachstum des Tumors spielen und daher Angriffspunkte für Therapien sein könnten. Einer dieser Kandidaten ist das BCKDK-Gen, welches im Kinome-wide Screening des NMI Reutlingen starken Einfluss auf das Überleben der Pankreaskarzinomzellen hatte (Buchholz et al., unveröffentlichte Ergebnisse).

### 5.1 Das Branched-Chain $\alpha$ -Ketoacid Dehydrogenase-Kinase-Gen

Das BCKDK-Gen kodiert für die Branched-Chain  $\alpha$ -Ketoacid Dehydrogenase-Kinase, die ein wichtiges Regulationsenzym im Katabolismus verzweigtkettiger Aminosäuren ist (Suryawan et al. 1998). Im Pankreaskarzinomgewebe wird die BCKDK-Kinase im Vergleich zum gesunden Gewebe vermehrt exprimiert. Zudem konnte das NMI Reutlingen im Kinome-wide Screening eine Apoptoseinduktion nach BCKDK-Repression in Panc-1-Zellen nachweisen (Buchholz et al., unveröffentlichte Ergebnisse). Diese Beobachtungen machten die BCKDK-Kinase zu einem interessanten Kandidaten für eine genauere Charakterisierung. In dieser Arbeit sollte mithilfe von Repressionsversuchen ihre Rolle in den molekulopathologischen Mechanismen des Pankreaskarzinoms ermittelt werden.

Um ein Inselgeschehen auszuschließen, wurden für die Einzelcharakterisierung der BCKDK sowohl Panc-1-Zellen als auch zwei weitere Zelllinien des Pankreaskarzinoms benutzt: S2-007- und PaTu-8988t-Zellen. Zudem wurde die Repression der BCKDK mit drei siRNAs (siRNA 1, 3 und 5) durchgeführt und die Versuchsergebnisse verglichen. In allen drei Zelllinien konnte mit zwei der drei siRNAs (siRNA 1 und 3) ein Absinken der Zellviabilität beobachtet werden. Die stärksten Effekte wurden dabei in den Panc-1- sowie den S2-007-Zellen nachgewiesen, weswegen die folgenden Versuche mit diesen beiden Zelllinien durchgeführt wurden. Um die Ursache für die abnehmende Zellviabilität herauszufinden, wurden sowohl Apopto-

se- als auch Proliferationsmarker untersucht. Wie im Ergebnisteil beschrieben, lieferten die Versuche mit den verschiedenen siRNAs unterschiedliche Ergebnisse.

## 5.2 Proteinregulation

Betrachtet man die Effekte der BCKDK-Repression mit der siRNA 1, fällt auf, dass in allen untersuchten Zelllinien die Zellviabilität abnimmt. Als Ursache hierfür kann eine Apoptoseinduktion in Form von PARP-Spaltprodukten nachgewiesen werden (Oliver et al. 1998). Des Weiteren sinkt die Proliferationsrate, hierzu passend zeigen die Zellen einen Arrest in der G2-Phase des Zellzyklus. Zeitgleich werden die Cycline A und D1, die als Aktivatoren der Cyclin-abhängigen Kinasen für das Voranschreiten des Zellzyklus von großer Bedeutung sind, herunter reguliert (Pagano et al. 1992, Lukas et al. 1996). Die Tumorsuppressoren p21 und p27 wirken als CDK-Inhibitoren (Xiong et al. 1993, Toyoshima et al. 1994). Sie werden in Pankreaskarzinomzellen vermindert gebildet und sind nach Behandlung mit der siRNA 1 vermindert (Hu et al. 1998, 2000).

Die siRNA 3 ähnelt in ihrer Wirkung der siRNA 1, die Zellviabilität nimmt ab und eine PARP-Spaltung geht vonstatten. Eine signifikante Abnahme der Proliferation kann jedoch nur in den Panc-1-Zellen nachgewiesen werden. Zudem wird, im Gegensatz zu der siRNA 1, kein G2-Arrest und keine Herabregulation der Cycline beobachtet. Die nachgewiesene PARP-Spaltung lässt vermuten, dass der geringen Abnahme der Zellviabilität bei den S2-007-Zellen eine Apoptose zugrunde liegt (Oliver et al. 1998). Die zusätzlich zur PARP-Spaltung aufgetretene Proliferationsabnahme bei den Panc-1-Zellen zeigt auf, dass ein Zusammenspiel aus Apoptoseinduktion und verminderter Proliferationsrate für die signifikante Abnahme der Zellviabilität dieser Zelllinie verantwortlich ist (Oliver et al. 1998). Wie nach Behandlung mit der siRNA 1 zeigen sich p21 und p27 in den S2-007-Zellen vermindert. P27 wird in den Panc-1-Zellen kaum gebildet, während p21 nach Behandlung mit der siRNA 3 stark ansteigt. Diese vermehrte Bildung von p21 ist eine mögliche Ursache für die verminderte Proliferationsrate der Panc-1-Zellen (Xiong et al. 1993).

Betrachtet man die Zellen nach Transfektion mit der siRNA 5, so fallen keine Veränderungen in der Zellviabilität auf. Es ist weder die Proliferation vermindert, noch eine Apoptoseinduktion nachzuweisen.



### 5.3 Funktionen der Branched-Chain $\alpha$ -Ketoacid Dehydrogenase-Kinase

Um die beobachteten Versuchsergebnisse interpretieren zu können, ist zunächst interessant, welche Aufgaben die BCKDK neben ihrer Funktion im Stoffwechsel noch in der Zelle erfüllt.

Im Rahmen einer Studie von Oyarzabal et al. wurden in Fibroblasten mit Nonsense-Mutation des BCKDK-Gens verschiedene Phänomene beobachtet (Oyarzabal et al. 2016). Die BCKD dieser Zellen ist aktiver, da sie nicht von der BCKDK gehemmt wird. Dadurch steigt die Belastung der Zellen mit Superoxiden, die von der vermehrt arbeitenden BCKD produziert werden. Der hiermit verbundene oxidative Stress hemmt die Arbeit der Mitochondrien, wodurch der ATP-Gehalt der Zellen sinkt. Es kommt zu einer Abnahme des bioenergetischen Potenzials. Dies führt zu einem G0-Arrest der Zellen (Oyarzabal et al. 2016). Wird das BCKDK-Gen in gesunden Zellen herunterreguliert, können ähnliche Ergebnisse beobachtet werden (Oyarzabal et al. 2016). In Fibroblasten von MSUD-Patienten funktioniert in Folge eines Gendefektes die BCKD nicht (Peinemann et al. 1994). Somit ist eine reaktive Steigerung des BCAA-Katabolismus in diesen Zellen nicht möglich. Wird die BCKDK nun herunter reguliert, ist kein Effekt des Knockdowns auf die Zellen nachzuweisen (Oyarzabal et al. 2016). Diese Untersuchungen zeigen, dass die BCKDK nur in die Regulation des Abbaus verzweigtkettiger Aminosäuren involviert ist.

Trotz dieser Datenlage kann nicht ausgeschlossen werden, dass die BCKDK in Karzinomzellen eine zusätzliche Funktion bekleidet, die sie in nicht-dysplastischen Zellen nicht hat. Ein Beispielprotein für eine solche zellspezifische Wirkweise ist der autokrine Motilitätsfaktor (AMF). Er fungiert intrazellulär im Glukosestoffwechsel als Glucose-6-Phosphat-Isomerase (Watanabe et al. 1996). In Tumorzellen wird AMF verstärkt exprimiert (Liotta et al. 1986). Im Gegensatz zu gesunden Zellen bleibt er in diesem Fall nicht nur intrazellulär, sondern wird zudem sezerniert (Tsutsumi et al. 2003). Extrazellulär wirkt er als Zytokin auf den AMF-Rezeptor, dessen Aktivierung zu einer vermehrten Proliferation, einer Hemmung der Apoptose und einer Motilitätssteigerung führt (Tsutsumi et al. 2003). Auf die gleiche Art und Weise könnte die BCKDK in Tumorzellen eine zusätzliche Funktion haben, die sie in gesunden Zellen nicht hat.

Unsere Versuche zeigen eine signifikante Abnahme der Zellzahl nach BCKDK-Repression in Pankreaskarzinomzellen. Die proliferationshemmende Wirkung der

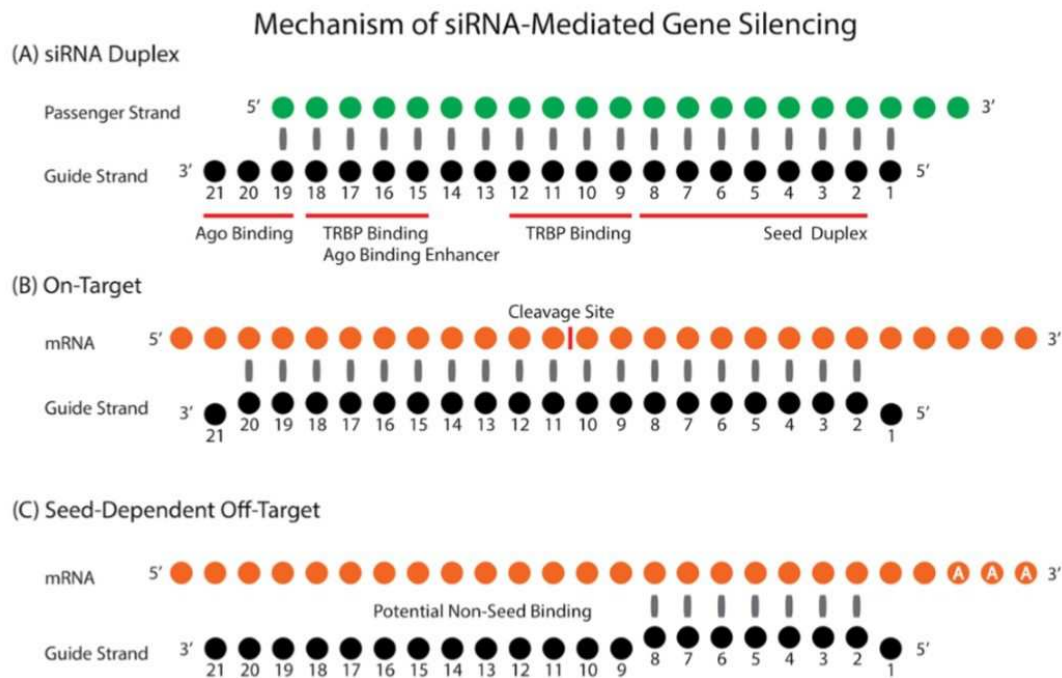
BCKDK-Repression kann durch seine Funktion im Katabolismus der verzweigtkettigen Aminosäuren erklärt werden: Bei übermäßiger Expression von BCKDK im Pankreaskarzinom sinkt die Aktivität der BCKD, da sie vermehrt gehemmt wird (Suryawan et al. 1998). Dies führt zu einem verminderten Abbau von Leucin, wodurch sein Spiegel steigt (Suryawan et al. 1998). Leucin aktiviert über den mTOR-Signalweg die Proteinsynthese und führt somit zur Proliferation der Zellen (Schriever et al. 2013). Zusätzlich stehen der Zelle vermehrt verzweigtkettige Aminosäuren zur Verfügung, die essentiell für den Aufbau von Proteinen und somit für das Zellwachstum sind (May et al. 1989).

Es wird vermutet, dass nun die Kinase mTOR über eine Hemmung der BCKDK zu einem vermehrten Abbau von Leucin führt, wodurch die Proliferation der Zellen wieder eingedämmt wird (Zhen et al. 2016). Dieser selbstregulierende Mechanismus kann jedoch nur in gesunden Zellen wirken, da in Pankreaskarzinomzellen eine Überexpression von BCKDK vorliegt. Hierdurch entgeht die Kinase dem Regulationsmechanismus.

Wird die BCKDK-Expression in den Pankreaskarzinomzellen supprimiert, steigt der Abbau von Leucin. Hierdurch entfällt das anabole Signal der Aminosäure und es kommt zu einer verminderten Proliferation der Zellen.

## 5.4 Off-Target-Effekte

SiRNAs ermöglichen über den RNA Interference Signalweg eine kontrollierte Repression des Zielgens (Chi et al. 2003). Der führende Strang der siRNA wird hierbei in den RISC (RNA-induced silencing complex) eingelagert und bindet sequenzspezifisch das Zielgen (Elbashir et al. 2001, Hutvágner et al. 2008). Nach der Hybridisierung wird die mRNA zwischen den Nukleotiden 10 und 11 der siRNA (vom 5'-Ende aus gesehen) gespalten und im Anschluss abgebaut (Kamola et al. 2015, Abb. 21). Der Proteinkomplex kann mehrere mRNA hintereinander binden und abbauen, worauf die Effizienz dieser Repressionsmethode beruht (Hutvágner et al. 2002).



**Abbildung 21: Graphische Darstellung der siRNA.**

(A) Aufbau des siRNA-Doppelstrangs mit Bindungsstellen für die RISC-Proteine. (B) Interaktion zwischen dem führenden Strang der siRNA (guide strand) und der mRNA des Zielgens. (C) Interaktion zwischen der Seed-Region des führenden siRNA-Strangs und der mRNA seines Off-Target-Gens.

*Abbildung entnommen aus Kamola et al. 2015.*

In einigen Studien wurde gezeigt, dass es in Abhängigkeit von der siRNA-Sequenz zum Knockdown eines Off-Target-Gens kommen kann (Scacheri et al. 2004). Diese Off-Target-Fehlerrate ist mit durchschnittlich 10% relativ hoch (Qiu et al. 2005).

Sind die Nukleotide von siRNA und mRNA vollständig komplementär, kommt es wie oben beschrieben zum Abbau der mRNA (Elbashir et al. 2001). Diese Wirkweise ist folglich hochspezifisch (Saxena et al. 2003) und in Untersuchungen wären sowohl die mRNA als auch das kodierte Protein vermindert. Zur Induktion des mRNA-Abbaus ist es jedoch ausreichend, wenn lediglich 11 Nukleotide aufeinanderfolgend übereinstimmen (Jackson et al. 2003). In einer Recherche mittels BLAST-Datenbank stimmte die Nukleotidabfolge der verwendeten siRNAs nur mit der BCKDK-mRNA signifikant überein (McGinnis et al. 2004). Die siRNA 1 hat jedoch zusätzlich starke Ähnlichkeiten zu einer weiteren mRNA: der SEL-1L2 (McGinnis et al. 2004). Für dieses Protein ist eine antiproliferative Wirkung auf Karzinomzellen beschrieben (Cattaneo et al. 2004). Eine Repression dieses Gens

durch eine Off-Target-Bindung der siRNA 1 würde die beobachteten Effekte dementsprechend nicht erklären.

Die Seed-Sequenz ist diejenige Sequenz der siRNA, der eine wesentliche Rolle in der Entstehung von Off-Target-Effekten zugeschrieben wird (Kamola et al. 2015). Es handelt sich hierbei um die Nukleotide 2 bis 7 vom 5'-Ende der siRNA aus (Sudbery et al. 2010). Diese Sequenz erkennt Off-Target-Gene in der 3'UT-Region der mRNA (Lewis et al. 2005). Für die Bindung muss sie jedoch vollständig komplementär zu der mRNA sein und das Watson-Crick-pairing eingehalten werden (Ui-Tei et al. 2008). Bindet die siRNA mit seiner Seed-Sequenz an das 3'UTR-Ende eines Gens, führt dies nicht zum Abbau der mRNA, sondern lediglich zu einer Hemmung der Translation (Doench et al. 2003). Die Non-Seed-Region (Nukleotide 8-15) beeinflusst die Effizienz des Off-Target-Knockdowns (Ui-Tei et al. 2008). In dieser Region ist die vollständige Komplementarität der jeweiligen RNA-Stränge nicht unabdingbar, es sind bis zu 4 Mismatches möglich (Saxena et al. 2003). Wirkt die siRNA über eine Inhibition der Translation, kann die mRNA des Off-Target-Gens weiterhin nachgewiesen werden, während das Protein herunter reguliert ist. Je nachdem, welches Off-Target-Gen von der siRNA gebunden und an der Translation gehindert wird, können verschiedene Effekte beobachtet werden (Scacheri et al. 2004).

In der vorliegenden Arbeit sind zwei Szenarien möglich: im ersten Szenario zeigt die siRNA 5 keinen Off-Target-Effekt, sondern lediglich die Effekte der BCKDK-Repression. In diesem Fall sprächen die Versuchsergebnisse gegen eine besondere Funktion der BCKDK in Pankreaskarzinomzellen, da weder die Zellviabilität, noch die Proliferationsrate verändert sind (vgl. Abb. 12 und 13). Die Effekte der siRNAs 1 und 3 sowie die Ergebnisse des Kinase-wide Screening wären auf die Repression von Off-Target-Genen zurückzuführen. Im zweiten Szenario liegt beim Knockdown mittels der siRNA 5 ein Off-Target-Effekt vor, der zu gegenregulativen Effekten führt: die Proliferation wird gefördert und die Apoptose inhibiert, wodurch die Wirkung des BCKDK-Knockdowns ausgeglichen würde. In den Versuchen mit der siRNA 5 wären dementsprechend keine Auswirkungen des Knockdowns darstellbar. Zeitgleich würde dies bedeuten, dass die siRNA 1 und bedingt die siRNA 3 die eigentliche Wirkung der BCKDK-Repression zeigen. Eine Hemmung der BCKDK wäre also proliferationshemmend und Apoptose-fördernd (vgl. Abb. 13

und 15). Bisher sind keine Veröffentlichungen über die verwendeten siRNAs erschienen, die auf einen Off-Target-Effekt hinweisen.

Um das Risiko von Off-Target-Effekten möglichst gering zu halten, müssen bestimmte Regeln bei der Herstellung von genspezifischen siRNA berücksichtigt werden (Kamola et al. 2015). So ist das Risiko eines Off-Target-Effekts erhöht, wenn die siRNA an die nicht translatierte Region (UTR) seines Zielgens bindet, weswegen eine Sequenzübereinstimmung in diesem Bereich zu vermeiden ist (Qiu et al. 2005). Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten siRNAs binden jedoch alle innerhalb des codierenden Bereichs des BCKDK-Gens (Suryawan et al. 1998, vgl. Abb. 22). Das Risiko eines Off-Target-Effekts sinkt mit steigender Länge der verwendeten siRNA, wobei bei einer Länge von 21 Nukleotiden ein Maximum an Spezifität erreicht ist (Qiu et al. 2005). Dabei stellen 2 der 21 Nukleotide einen Überhang am 3'-Ende dar (Elbashir et al. 2001). Bevor der führende Strang der siRNA an seine Ziel-mRNA binden kann, muss der siRNA-Doppelstrang durch die Helikase vom 5'-Ende des führenden Stranges aus aufgelöst werden (Nykänen et al. 2001). Vermutungen legen nahe, dass die Helikase durch Bindung an einen G/C-reichen Bereich inhibiert wird (Ui-Tei et al. 2004). Daher gilt für den Aufbau der siRNA, dass das 5'-Ende des führenden Strangs sowie die daran anschließende Seed-Region A/U-reich sein sollte, um eine Wirkung der Helikase in diesem Bereich zu ermöglichen (Ui-Tei et al. 2004). Im Gegensatz hierzu ist in der Non-Seed-Region ein hoher G/C-Gehalt anzustreben, um eine Auflösung des Doppelstranges vom falschen Ende aus zu verhindern (Ui-Tei et al. 2004, Kamola et al. 2015). Insgesamt sollte keine G/C-Folge länger als 9 Nukleotide sein, da es in diesem Fall zu einer Hemmung der Helikase und somit zu einem Abbruch der Doppelstrangauflösung kommen kann (Ui-Tei et al. 2004). Die drei siRNAs, die in der vorliegenden Arbeit benutzt worden sind, erfüllen diese Kriterien (vgl. Tabelle 12). Jedoch wird empfohlen, dass die Seed-Region des führenden siRNA-Stranges mindestens fünf A/U-Nukleotide enthält (Ui-Tei et al. 2004). Die siRNA 1 enthält in diesem Bereich nur 4 A/U-Nukleotide, was Off-Target-Effekte begünstigen könnte.

## 5.5 Die mRNA der Branched-Chain $\alpha$ -Ketoacid Dehydrogenase-Kinase

Als weiterer potentieller Mechanismus für die beobachteten Effekte in den behandelten Zellen müssen Introns in Betracht gezogen werden, die zuvor im Nukleus aus der prä-mRNA des BCKDK-Proteins herausgespleißt wurden (Mattick 1994).

Diese Introns können als non-coding RNA sowohl proliferative als auch anti-proliferative Wirkungen in der Zelle entfalten und somit zur Verfälschung von Versuchsergebnissen führen (Zhao et al. 2005, Dinger et al. 2008). Sie werden nicht vom Knockdown des Zielproteins beeinflusst, da die siRNA erst im Zytoplasma an die fertige mRNA bindet (Chi et al. 2003). Um diese Fehlerquelle zu umgehen wäre eine Herunterregulation auf DNA-Ebene nötig.

Es sind drei Isoformen (Isoform 1, 2 und 3) der BCKDK bekannt, die durch alternatives Spleißen während der Transkription entstehen und dieselbe Funktion bekleiden (Ota et al. 2004, Gerhard 2004). Während das ursprüngliche Protein aus 412 Aminosäuren besteht, fehlen bei ihren zwei Isoformen (Isoform 2 und 3) die Aminosäuren 366-412 (Ota et al. 2004, Gerhard 2004). Bei der zweiten Isoform fehlen zusätzlich die Aminosäuren 282-311 (Gerhard 2004). Die siRNAs 1 und 5 binden die mRNA aller drei BCKDK-Isoformen (vgl. Abb. 22-24). Die siRNA 3 bindet hingegen nur die Isoformen 1 und 3, da die Nukleotidsequenz, an die sie bindet, im Kodierungsbereich für die Aminosäuren 282-311 liegt (vgl. Abb. 22-24). Dies bedeutet, dass durch die siRNA 3 nicht alle Spleißvarianten ausgeschaltet werden. Der BCKDK-Antikörper, der in den Westernblot-Analysen verwendet wurde, bindet nur die ursprüngliche Form des Proteins, jedoch keine seiner Isoformen (vgl. Abb. 25). Dies erklärt, warum auch durch die siRNA 3 eine signifikante Reduktion der BCKDK im Westernblot nachgewiesen werden konnte. Mithilfe einer qRT-PCR wurde zudem eine signifikante Reduktion der BCKDK-mRNA nachgewiesen. Der hBCKDK-Primer, der für die qRT-PCR verwendet wurde, bindet die mRNA aller drei Isoformen (vgl. Abb. 22-24). Dementsprechend wäre zu erwarten, dass in den mit der siRNA 3 behandelten Zellen in der qRT-PCR ein unvollständiger Knockdown zu sehen ist, da die mRNA der Isoform 2 vom hBCKDK-Primer gebunden und amplifiziert wird. Die signifikante Repression der BCKDK-mRNA für alle drei siRNAs spricht daher gegen eine unvollständige BCKDK-Repression durch die siRNA 3.

Sollte trotzdem ein unvollständiger Knockdown von BCKDK bei der siRNA 3 vorliegen, kann er eine Ursache für die Zelltyp-abhängigen Versuchsergebnisse für den siRNA 3-Knockdown sein. So ist es möglich, dass die weiterhin exprimierte BCKDK-Isoform in den S2-007-Zellen ausgeprägt wirkt, während sie in den Panc-1-Zellen nur eine untergeordnete Rolle hat. Dies würde die nur leicht verminderte Zellviabilität sowie die unveränderte Proliferationsrate der S2-007-Zellen nach Be-

handlung mit der siRNA 3 erklären (vgl. Abb. 12 und 13). Andererseits kann die weiterhin aktive Isoform in den Panc-1-Zellen paradox wirken und der Grund für den starken Anstieg der p21-Bildung sein (vgl. Abb. 19), der zu einer Hemmung der Proliferation zusätzlich zur Apoptoseinduktion führt (Xiong et al. 1993). Die gesteigerte p21-Expression kann jedoch durch viele verschiedene Mechanismen ausgelöst werden, darunter zellulärer Stress und DNA-Schäden (Kuwano et al. 1996). Somit ist eine genaue Bestimmung der zugrundeliegenden Mechanismen schwierig und bedarf weiterer Untersuchungen.

## 5.6 Weitere Einflussfaktoren

Neben den bereits beschriebenen Mechanismen bestimmt die Kinetik des Knockdown-Prozesses die Effizienz der siRNA (Bartlett et al. 2006). Die Kinetik beschreibt hierbei die Zeit, die die siRNA braucht, um den mRNA-Abbau zu bewirken (Raab et al. 2004). Wirkt die siRNA 5 langsamer als die anderen verwendeten siRNAs, kann sie ihre volle Wirkung im Beobachtungszeitraum nicht entfalten. Die Expression der BCKDK wäre erst kurz vor Entnahme der Lysate herunter geregelt worden. Somit würden die qRT-PCR sowie die Western Blots einen befriedigenden Knockdown der BCKDK zeigen, die Repression des Proteins hätte jedoch noch keine Wirkung auf die Zellen gehabt. Um diese Fehlerquelle ausschließen zu können, müsste man die Ergebnisse zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion validieren (Raab et al. 2004).

## 5.7 Schlussfolgerung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit diente dazu, die Rolle der BCKDK in der Pathogenese und Aufrechterhaltung des Pankreaskarzinoms zu untersuchen. Ihre Funktion im Pankreaskarzinom wurde in dieser Arbeit erstmalig untersucht.

Vorhergehende Analysen zeigten, dass die BCKDK in Zellen des PDAC vermehrt exprimiert wird, was für eine pro-onkogene Funktion sprechen könnte. Ein proliferationsfördernder Effekt konnte jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden. Nur zwei der drei untersuchten siRNAs induzieren mit ihrer BCKDK-Repression eine Apoptose (siRNA 1 und 3). Die siRNA 1 zeigt zusätzlich eine proliferationshemmende Wirkung durch Abnahme der Cycline und folglich einen Zellzyklusarrest. Nimmt man an, dass die siRNA 1 den Effekt der BCKDK-Repression aufzeigt, so ist von einer proliferationsfördernden Wirkung des Proteins auszugehen. Eine tie-

fergehende Prüfung der BCKDK als mögliches Therapieziel wäre in diesem Fall erstrebenswert. Der genaue Mechanismus, der hinter diesen Effekten steht, konnte jedoch nicht vollständig aufgeklärt werden. Ebenso fraglich bleibt, ob Off-Target-Effekte der verwendeten siRNAs und die Repressionskinetik der siRNA 5 eine Rolle in den Mechanismen spielen. Daher sollte in weitergehenden Analysen das Auftreten von Off-Target-Effekten untersucht werden. Zum einen kann durch Zuhilfenahme weiterer siRNAs eine Reproduktion der beobachteten Effekte versucht, zum anderen die siRNA 1, 3 und 5 auf ihre Bindung an Off-Target-Genen geprüft werden. Auch die Kinetik der siRNA 5 bedarf weiterer Analysen. Hierzu muss die Repression der BCKDK zu unterschiedlichen Zeitpunkten validiert werden. Ein besonderes Augenmerk ist auf den Zeitraum bis zu 24 Stunden nach Transfektion zu legen, um eine langsamere Repression von BCKDK durch die siRNA 5 nachweisen zu können.



## 6. Zusammenfassung

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) zeichnet sich durch eine hohe Mortalität aus: die Fünf-Jahres-Überlebensrate liegt bei nur 8%. Ursächlich hierfür ist zum einen die späte Diagnose aufgrund fehlender Frühsymptome, sodass der Tumor bei Erstdiagnose oftmals schon metastasiert und eine operative Entfernung nicht möglich ist. Zum anderen zeigen sich Pankreaskarzinome äußerst resistent gegen eine chemotherapeutische Behandlung.

Nach dem derzeitigen Stand der Forschung entsteht das PDAC aus Vorläuferläsionen durch eine Akkumulation charakteristischer Genmutationen. Die genauen molekularpathologischen Mechanismen sind jedoch noch nicht verstanden. Dementsprechend wurde in den letzten Jahren intensiv nach Proteinen gesucht, die eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Pankreaskarzinoms spielen und somit Angriffspunkte für neue Therapien darstellen.

Eines dieser Proteine ist die Branched-Chain  $\alpha$ -Ketoacid Dehydrogenase-Kinase (BCKDK). In einem Kinom-Screening zeigte sich nach Repression von BCKDK in Pankreaskarzinomzellen eine erhöhte Apoptoserate. Zudem konnte eine vermehrte Expression des BCKDK-Gens in primären humanen Pankreaskarzinomgeweben nachgewiesen werden. Die BCKDK reguliert die Branched-Chain  $\alpha$ -Ketoacid Dehydrogenase und ist somit ein Schlüsselenzym im Abbau verzweigtkettiger Aminosäuren. Eine weitere Funktion der Kinase ist bisher nicht beschrieben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die möglicherweise pro-onkogene Wirkung der BCKDK im PDAC näher untersucht. Hierzu wurde die Expression der Kinase mithilfe dreier siRNAs (siRNA 1, 3 und 5) in zwei Pankreaskarzinomzelllinien supprimiert und jeweils die Auswirkungen auf Apoptose, Proliferation und Expression von Zielproteinen untersucht.

Die Versuchsreihen lieferten unterschiedliche Ergebnisse. Die Verwendung der siRNA 1 führte in beiden Zelllinien zu einer Abnahme der Zellviabilität. Als Ursache hierfür konnte eine Apoptoseinduktion nachgewiesen werden. Zusätzlich sank die Proliferationsrate und es kam zu einem Zellzyklusarrest der Zellen in der G2-Phase. Die Repression des Zielgens mit der siRNA 3 führte ebenfalls zu einer Abnahme der Zellviabilität durch Apoptoseinduktion, es kam jedoch nur in einer der verwendeten Zelllinien zu einer signifikanten Abnahme der Proliferationsrate. Die Zellen, die mit der siRNA 5 transfiziert worden waren, blieben hingegen sowohl in

der Zellviabilität als auch in der Proliferation im Vergleich zur Kontrolle unverändert.

Diese sehr unterschiedlichen Versuchsergebnisse sind möglicherweise durch Off-Target-Effekte der siRNAs zu erklären. Die zugrundeliegenden molekularpathologischen Mechanismen konnten in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht vollständig aufgedeckt werden und bedürfen weiterer Analysen.

## Summary

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is characterized by its high mortality: the five-year overall survival is only 8%. One of the reasons for this is the usually late diagnosis as early symptoms rarely occur. Thus, when first diagnosed, the tumor is often already metastasized and surgery is no longer possible. Another important factor is its high resistance against chemotherapeutic intervention.

According to the current state of research, PDAC develops from precursor lesions due to an accumulation of characteristic genetic mutations. The exact molecular mechanisms are not yet understood. Hence, research tries to identify proteins with relevance for the pathogenesis of pancreatic cancer, which might be targeted by new anticancer therapies.

One of those proteins is the Branched-Chain  $\alpha$ -Ketoacid Dehydrogenase-Kinase (BCKDK). In a kinome-wide screening, pancreatic cancer cells showed an increase in apoptotic activity after suppression of BCKDK. Additionally, an elevated BCKDK-expression was found in primary human PDAC tissues. The BCKDK regulates the Branched-Chain  $\alpha$ -Ketoacid Dehydrogenase and therefore functions as a major regulator of the branched-chain amino acid catabolism. Different functions could not be identified to date.

In this thesis, the pro-oncogenic effect of the BCKDK in PDAC was investigated. For this purpose, the expression of BCKDK was suppressed by transfecting three different siRNAs (siRNA 1, 3 and 5) in two pancreatic carcinoma cell lines. Subsequently, the effects of the knockdown on apoptosis, proliferation and protein expression were analyzed.

The experiments showed different results depending on the employed siRNA. When using siRNA 1, cell viability in both cell lines decreased as a result of increased apoptosis induction. Additionally, the proliferation rate dropped and cells arrested in the G2-phase of the cell cycle. Likewise, repression of the target gene

with siRNA 3 led to a decrease of cell viability as well as an elevated apoptotic rate. However, only one of the two cell lines showed a decrease in proliferation. Those cells transfected with siRNA 5 did not show any differences to the control cells, neither in cell viability nor in proliferation.

These diverse results can possibly be explained by off-target-effects of the siRNA. The underlying pathologic mechanisms could not be revealed entirely in this thesis and further research is required.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AMF	Autokriner Motilitätsfaktor
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCAA	verzweigtkettige Aminosäuren (engl.: branched chain amino acids)
BCAT	Branched-Chain Aminotransferase
BCKD	Branched-Chain $\alpha$ -Ketoacid Dehydrogenase
BCKDK	BCKD-Kinase
BDP	BCKD-Phosphatase
BRCA2	Breast cancer type 2 susceptibility-Protein
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Kälberserumalbumin (engl.: bovine serum albumin)
CA 19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9
CDK	Cyclin-abhängige Kinase (engl.: cyclin-dependent kinase)
cDNA	komplementäre DNA (engl.: complementary DNA)
Cis	Carcinoma in situ
CoA	Coenzym A
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoff
dd.	destilliert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (engl. desoxyribonucleic acid)
DTT	Dithiothreitol

ECL	Enhanced Chemiluminescence-Substrat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (engl.: epidermal growth factor)
ELISA	Enzymimmunoassay (engl.: enzyme linked immunosorbent assay)
FACS	fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (engl.: fluorescence-activated cell sorting)
FBS	fetales Rinderserum (engl.: fetal bovine serum)
FBS-DMEM	DMEM versetzt mit 10% FBS
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure (engl.: $\gamma$ -aminobutyric acid)
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCl	Salzsäure
HEK293	humane embryonale Nierenzellen 293 (engl.: human embryonic kidney cells 293)
HRP	Meerrettich-Peroxidase (engl.: horseradish peroxidase)
IgG	Immunglobulin G
K-ras	Kirsten rat sarcoma viral oncogene-Homolog
KIC	$\alpha$ -Ketoisocaproat
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-activated-Proteinkinase
mg, g	Milligramm, Gramm
$\mu$ l, ml	Mikroliter, Milliliter
mM, M	millimolar, molar
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MSUD	Ahornsirupkrankheit (engl.: maple syrup urine disease)
mTOR	Zielprotein des Rapamycins (engl.: mechanistic target of

	rapamycin)
MTT	Thiazolylblau (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)
$\text{Na}_3\text{VO}_4$	Trinatriumtetraoxovanadat
$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$	Natriumpyrophosphat Decahydrat
$\text{NaCl}$	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
$\text{NaF}$	Natriumfluorid
nm	Nanometer
NMI	Naturwissenschaftliches und medizinisches Institut
ns-siRNA	non-silencing siRNA
ntd	unbehandelt (engl.: non-treated)
Oligo-dT	Oligo-Desoxythymidin
p16/ p21/ p27	CDK-Inhibitor 2A/ CDK-Inhibitor 1/ CDK-Inhibitor 1B
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasien
PARP	Poly-ADP-ribose-Polymerase
PBS	Phosphatpuffersalzlösung (engl.: phosphate buffered saline)
PDAC	duktales Adenokarzinom des Pankreas (engl.: pancreatic ductal adenocarcinoma)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
PPAR- $\alpha$	Peroxisom-Poliferator-aktivierte Rezeptoren Typ $\alpha$
qRT-PCR	quantitative RealTime-Polymerase-Kettenreaktion
R0-Resektion	Entfernung des Tumors im Gesunden
RISC	RNA-induced silencing complex
rLE/s	relative Lichteinheiten pro Sekunde
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)

RPLP0	Ribosomal protein lateral stalk subunit P0
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SDS-PAGE	Sodium-Dodecyl-Sulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA	silencing RNA
Std	Stunde
T <sub>4</sub>	Thyroxin
TBS-T	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (engl.: tris-buffered saline) + Tween 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- $\beta$	Transformierender Wachstumsfaktor Typ $\beta$ (engl.: transforming growth factor type $\beta$ )
TNM	Klassifikation nach Tumor, Nodi (Lymphknoten) und Metastasen
Tris Base	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UpM	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierter Bereich (engl.: untranslated region)
V	Volt
VEGF	endothelialer Wachstumsfaktor (engl.: vascular endothelial growth factor)

## 8. Literaturverzeichnis

1. Agrawal N, Dasaradhi PVN, Mohammed A et al. (2003): RNA interference: Biology, mechanism, and applications. In: Microbiology and Molecular Biology Reviews 67, S. 657–685.
2. Apte MV, Haber PS, Applegate TL et al. (1998): Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. In: Gut 43, S. 128–133.
3. Bailey JM, Swanson BJ, Hamada T (2008): Sonic hedgehog promotes desmoplasia in pancreatic cancer. In: Clinical Cancer Research 14, S. 5995–6004.
4. Bardeesy N, DePinho RA (2002): Pancreatic cancer biology and genetics. In: Nature Reviews. Cancer 2, S. 897–909.
5. Bardeesy N, Aguirre AJ, Chu GC et al. (2006): Both p16<sup>Ink4a</sup> and the p19<sup>Arf</sup>-p53 pathway constrain progression of pancreatic adenocarcinoma in the mouse. In: Proceedings of the National Academy of Sciences 103, S. 5947–5952.
6. Bartlett DW, Davis MW (2006): Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging. In: Nucleic Acids Research 34, S. 322–333.
7. Beger HG, Rau B, Gansauge F et al. (2008): Bauchspeicheldrüsenkrebs – Heilungschancen minimal. In: Deutsches Ärzteblatt 105, S. 255–262.
8. Biankin AV, Kench JG, Morey AL et al. (2001): Overexpression of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> is an early event in the development of pancreatic intraepithelial neoplasia. In: Cancer Research 61, S. 8830–8837.
9. Blaine SA, Ray KC, Branch KM et al. (2009): Epidermal growth factor receptor regulates pancreatic fibrosis. In: American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology 297, S. 434–441.
10. Buchholz M, Braun M, Heidenblut A et al. (2005): Transcriptome analysis of microdissected pancreatic intraepithelial neoplastic lesions. In: Oncogene 24, S. 6626–6636.



11. Buchholz M, Gress TM (2009): Molecular changes in pancreatic cancer. In: *Expert Review of Anticancer Therapy* 9, S. 1487–1497.
12. Burris HA 3rd, Moore MJ, Andersen J et al. (1997): Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. In: *Journal of Clinical Oncology* 15, S. 2403–2413.
13. Cattaneo M, Canton C, Albertini A et al. (2004): Identification of a region within SEL1L protein required for tumour growth inhibition. In: *Gene* 326, S. 149–156.
14. Chen J, Zhang W (2012): Kinetic analysis of the effects of target structure on siRNA efficiency. In: *The Journal of Chemical Physics* 137:225102.
15. Chi JT, Chang HY, Wang NN et al. (2003): Genomewide view of gene silencing by small interfering RNAs. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, S. 6343–6346.
16. Chu GC, Kimmelman AC, Hezel AF et al. (2007): Stromal biology of pancreatic cancer. In: *Journal of Cellular Biochemistry* 101, S. 887–907.
17. Cohen GM (1997): Caspases: the executioners of apoptosis. In: *Biochemical Journal* 326, S. 1–16.
18. Cook KG, Bradford AP, Yeaman SJ et al. (1984): Regulation of bovine kidney Branched-Chain 2-Oxoacid Dehydrogenase Complex by reversible phosphorylation. In: *European Journal of Biochemistry* 145, S. 587–591.
19. Cubilla AL, Fitzgerald PJ (1975): Morphological patterns of primary nonendocrine human pancreas carcinoma. In: *Cancer Research* 35, S. 2234–2248.
20. Cubilla AL, Fitzgerald PJ (1976): Morphological lesions associated with human primary invasive nonendocrine pancreatic cancer. In: *Cancer Research* 36, S. 2690–2698.
21. Dinger ME, Mercer TR, Mattick JS (2008): RNAs as extracellular signaling molecules. In: *Journal of Molecular Endocrinology* 40, S. 151–159.
22. Doench JG, Petersen CP, Sharp PA (2003): siRNAs can function as miRNAs. In: *Genes & Development* 17, S. 438–442.

23. Doisaki M, Katano Y, Nakano I et al. (2010): Regulation of hepatic Branched-Chain alpha-Keto acid Dehydrogenase Kinase in a rat model for type 2 diabetes mellitus at different stages of the disease. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 393, S. 303–307.
24. Easton D, Thompson D, McGuffog L et al. (1999): Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. In: *Journal of the National Cancer Institute* 91, S. 1310–1316.
25. Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A et al. (2001): Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. In: *The EMBO Journal* 20, S. 6877–6888.
26. Ellenrieder V, Alber B, Lacher U et al. (2000): Role of MT-MMPs and MMP-2 in pancreatic cancer progression. In: *International Journal of Cancer* 85, S. 14–20.
27. Falke CH, Linke W, Raßler B et al. (2008): *Taschenatlas Physiologie*. 1. Auflage, Urban & Fischer. S. 338–351. ISBN: 978-3-437-41917-1.
28. Friess H, Berberat P, Schilling M et al. (1996): Pancreatic cancer: the potential clinical relevance of alterations in growth factors and their receptors. In: *Journal of Molecular Medicine* 74, S. 35–42.
29. Funasaka T, Raz A (2007): The role of Autocrine Motility Factor in tumor and tumor microenvironment. In: *Cancer and Metastasis Reviews* 26, S. 725–735.
30. García-Cazorla A, Oyarzabal A, Fort J et al. (2014): Two novel mutations in the BCKDK (Branched-Chain Keto-acid Dehydrogenase Kinase) gene are responsible for a neurobehavioral deficit in two pediatric unrelated patients. In: *Human Mutation* 35, S. 470–477.
31. Gerhard DS (2004): The status, quality, and expansion of the NIH full-length cDNA project: The Mammalian Gene Collection (MGC). In: *Genome Research* 14, S. 2121–2127.
32. Goggins M, Hruban RH, Kern SE (2000): BRCA2 is inactivated late in the development of pancreatic intraepithelial neoplasia. In: *American Journal of Pathology* 156, S. 1767–1771.

33. Hackeng WM, Hruban RH, Offerhaus GJA et al. (2016): Surgical and molecular pathology of pancreatic neoplasms. In: *Diagnostic Pathology* 11, S. 47–64.
34. Harris RA, Zhang B, Goodwin GW et al. (1990): Regulation of the Branched-Chain  $\alpha$ -Ketoacid Dehydrogenase and elucidation of a molecular basis for maple syrup urine disease. In: *Advances in Enzyme Regulation* 30, S. 245–263.
35. Harris RA, Popov KM, Shimomura Y et al. (1992): Purification, characterization, regulation and molecular cloning of mitochondrial protein kinases. In: *Advances in Enzyme Regulation* 32, S. 267–284.
36. Harris RA, Popov KM, Kedishvili NY et al. (1993): Molecular cloning of the Branched-Chain  $\alpha$ -Keto acid Dehydrogenase Kinase and the CoA-dependent Methylmalonate Semialdehyde Dehydrogenase. In: *Advances in Enzyme Regulation* 33, S. 255–265.
37. Harris RA, Popov KM, Zhao Y et al. (1995): A new family of protein kinases – the mitochondrial protein kinases. In: *Advances in Enzyme Regulation* 35, S. 147–162.
38. Harris RA, Popov KM, Zhao Y (1995): Nutritional regulation of the protein kinases responsible for the phosphorylation of the  $\alpha$ -Ketoacid Dehydrogenase Complexes. In: *Journal of Nutrition* 125, S. 1758S–1761S.
39. Harris RA, Hawes JW, Popov KM et al. (1997): Studies on the regulation of the mitochondrial  $\alpha$ -Ketoacid Dehydrogenase Complexes and their kinases. In: *Advances in Enzyme Regulation* 31, S. 271–293.
40. Harris RA, Kobayashi R, Murakami T et al. (2001): Regulation of Branched-Chain  $\alpha$ -Keto acid Dehydrogenase Kinase expression in rat liver. In: *Journal of Nutrition* 131, S. 841S–845S.
41. Harris RA, Joshi M, Jeoung NH (2004): Mechanisms responsible for regulation of branched-chain amino acid catabolism. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313, S. 391–396.
42. Harris RA, Joshi M, Jeoung NH et al. (2005): Overview of the molecular and biochemical basis of branched-chain amino acid catabolism. In: *Journal of Nutrition* 135, S. 1527S–1530S.

43. Hruban RH, Van Mansfeld ADM, Offerhaus GJA et al. (1993): K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas: a study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. In: *American Journal of Pathology* 143, S. 545–554.
44. Hruban RH, Goggins M, Parsons J et al. (2000): Progression model for pancreatic cancer. In: *Clinical Cancer Research* 6, S. 2969–2972.
45. Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J et al. (2001): Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. In: *American Journal of Surgical Pathology* 25, S. 579–586.
46. Hruban RH, Takaori K, Klimstra DS et al. (2004): An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. In: *American Journal of Surgical Pathology* 28, S. 977–987.
47. Hruban RH, Maitra A, Schlick R et al. (2008): Emerging molecular biology of pancreatic cancer. In: *Gastrointestinal Cancer Research* 2, S. 10–15.
48. Hu YX, Watanabe H, Ohtsubo K et al. (1998): Infrequent expression of p21 is related to altered p53 protein in pancreatic carcinoma. In: *Clinical Cancer Research* 4, S. 1147–1152.
49. Hu YX, Watanabe H, Li P et al. (2000): An immunohistochemical analysis of p27 expression in human pancreatic carcinomas. In: *Pancreas* 21, S. 226–230.
50. Huang YS, Chuang DT (1999): Down-regulation of rat mitochondrial Branched-Chain 2-Oxoacid Dehydrogenase Kinase gene expression by glucocorticoids. In: *Biochemical Journal* 339, S. 503–510.
51. Hutson SM (2006): The case for regulating indispensable amino acid metabolism: the Branched-Chain  $\alpha$ -Keto acid Dehydrogenase Kinase-knockout mouse. In: *Biochemical Journal* 400, S. E1–E3.
52. Hutvagner G, Zamore PD (2002): A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. In: *Science* 297, S. 2056–2060.
53. Hutvagner G, Simard MJ (2008): Argonaute proteins: key players in RNA silencing. In: *Nature* 9, S. 22–32.

54. Hwang RF, Moore T, Arumugam T et al. (2008): Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. In: *Cancer Research* 68, S. 918–926.
55. Jackson AL, Bartz SR, Schelter J et al. (2003): Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. In: *Nature Biotechnology* 21, S. 635–638.
56. Jaffee EM, Hruban RH, Canto M et al. (2002): Focus on pancreas cancer. In: *Cancer Cell* 2, S. 25–28.
57. Joshi MA, Jeoung NH, Obayashi M et al. (2006): Impaired growth and neurological abnormalities in Branched-Chain  $\alpha$ -Keto acid Dehydrogenase Kinase-deficient mice. In: *Biochemical Journal* 400, S. 153–162.
58. Kamola PJ, Nakano Y, Takahashi T et al. (2015): The siRNA non-seed region and its target sequences are auxiliary determinants of off-target effects. In: *Public Library of Science Computational Biology* 11(12): e1004656.
59. Kivinen L, Tsubari M, Haapajärvi T et al. (1999): Ras induces p21<sup>Cip1/Waf1</sup> cyclin kinase inhibitor transcriptionally through Sp1-binding sites. In: *Oncogene* 18, S. 6252–6261.
60. Kobayashi R, Shimomura Y, Otsuka M et al. (2000): Experimental hyperthyroidism causes inactivation of the Branched-Chain alpha-Ketoacid Dehydrogenase Complex in rat liver. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 375, S. 55–61.
61. Komar G, Kauhanen S, Liukko K et al. (2009): Decreased blood flow with increased metabolic activity: a novel sign of pancreatic tumor aggressiveness. In: *Clinical Cancer Research* 15, S. 5511–5517.
62. Koolman J, Röhm KH (2009): *Taschenatlas Biochemie des Menschen*. 4. Auflage, Thieme. S. 410. ISBN: 978-3-13-759404-8.
63. Korc M (2007): Pancreatic cancer-associated stroma production. In: *American Journal of Surgery* 194, S. 84–86.
64. Kuwano K, Kunitake R, Kawasaki M et al. (1996): P21Waf1/Cip1/Sdi1 and p53 expression in association with DNA strand breaks in idiopathic pulmo-

- nary fibrosis. In: American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 154, S. 477–483.
65. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, Kurzversion 1.0, 2013 AWMF Registernummer:032-010OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html>
  66. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP (2005): Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. In: Cell 120, S. 15–20.
  67. Li C, Heidt DG, Dalerba P et al. (2007): Identification of pancreatic stem cells. In: Cancer Research 67, S. 1030–1037.
  68. Liggett WH Jr, Sidransky D (1998): Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. In: Journal of Clinical Oncology 16, S. 1197–1206.
  69. Liotta LA, Mandler R, Murano G et al. (1986): Tumor cell autocrine motility factor. In: Proceedings of the National Academy of Sciences USA 83, S. 3302–3306.
  70. Lukas J, Bartkova J, Bartek J (1996): Convergence of mitogenic signalling cascades from diverse classes of receptors at the Cyclin D–Cyclin-dependent kinase–pRb-controlled G1 checkpoint. In: Molecular and Cellular Biology 16, S. 6917–6925.
  71. Lüttges J, Reinecke-Luthge A, Mollmann B et al. (1999): Duct changes and K-ras mutations in the disease-free pancreas: analysis of type, age relation and spatial distribution. In: Virchows Archiv 435, S. 461–468.
  72. Lynch CJ, Halle B, Fujii H et al. (2003): Potential role of leucine metabolism in the leucine-signaling pathway involving mTOR. In: American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism 285, S. E854–E863.
  73. Machius M, Chuang JL, Wynn RM et al. (2001): Structure of rat BCKD kinase: Nucleotide-induced domain communication in a mitochondrial protein kinase. In: Proceedings of the National Academy of Sciences 98, S. 11218–11223.
  74. Mahadevan D, Von Hoff DD (2007): Tumor-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma. In: Molecular Cancer Therapy 6, S. 1186–1197.

75. Malaisse WJ, Hutton JC, Carpinelli AR et al. (1980): The stimulus-secretion coupling of amino acid-induced insulin release: metabolism and cationic effects of leucine. In: *Diabetes* 29, S. 431–437.
76. Manning G, Whyte DB, Martinez R et al. (2002): The protein kinase complement of the human genome. In: *Science* 298, 1912–1934.
77. Mattick JS (1994): Introns: evolution and function. In: *Current Opinion in Genetics and Development* 4, S. 823–831.
78. May ME, Buse MG (1989): Effects of branched-chain amino acids on protein turnover. In: *Diabetes/ Metabolism Research and Reviews* 5, S. 227–245.
79. McGinnis S, Madden TL (2004): BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. In: *Nucleic Acids Research* 32, S. W20–W25.
80. Morton JP, Klimstra DS, Mongeau ME et al. (2008): Trp53 deletion stimulates the formation of metastatic pancreatic tumors. In: *The American Journal of Pathology* 172, S. 1081–1087.
81. Morton JP, Timpson P, Karim SA et al. (2010): Mutant p53 drives metastasis and overcomes growth arrest/ senescence in pancreatic cancer. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, S. 246–251.
82. Muller EA, Danner DJ (2004): Tissue-specific translation of murine Branched-chain  $\alpha$ -Ketoacid Dehydrogenase Kinase mRNA is dependent upon an upstream open reading frame in the 5'-untranslated region. In: *Journal of Biological Chemistry* 279, S. 44645–44655.
83. Nazli O, Bozdag AD, Tansug T et al. (2000): The diagnostic importance of CEA and CA 19-9 for the early diagnosis of pancreatic carcinoma. In: *Hepato-gastroenterology* 47, S. 1750–1752.
84. Neesse A, Michl P, Frese KK et al. (2011): Stromal biology and therapy in pancreatic cancer. In: *Gut* 60, S. 861–868.
85. Neesse A, Algül H, Tuveson DA et al. (2015): Stromal biology and therapy in pancreatic cancer: a changing paradigm. In: *Gut* 64, S.1476–1484.

86. Novarino G, El-Fishawy P, Kayserili H et al. (2012): Mutations in BCKD-Kinase lead to a potentially treatable form of autism with epilepsy. In: *Science* 338, S. 394–397.
87. Nykänen A, Haley B, Zamore P (2001): ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA Interference pathway. In: *Cell* 107, S. 309–321.
88. Obayashi M, Sato Y, Harris RA et al. (2001): Regulation of the activity of Branched-Chain 2-Oxo acid Dehydrogenase (BCODH) Complex by binding BCODH kinase. In: *Federation of European Biochemical Societies Letters* 491, S. 50–54.
89. Odessey R (1982): Purification of rat kidney Branched-Chain Oxo acid Dehydrogenase Complex with endogenous kinase activity. In: *Biochemical Journal* 204, S. 353–356.
90. Oettle H, Heinemann V, Herrmann R et al. (2010): Onkopedia Leitlinie Pankreaskarzinom. In: Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V., <https://www.onkopedia.com/de/wissensdatenbank/wissensdatenbank/pankreaskarzinom/AWMFS3Leitlinie2013.pdf>.
91. Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ et al. (2009): Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. In: *Science* 324, S. 1457–1461.
92. Oliver FJ, De la Rubia G, Rolli V et al. (1998): Importance of Poly (ADP-ribose) Polymerase and its cleavage in apoptosis. In: *The Journal of Biological Chemistry* 273, S. 33533–33539.
93. Ota T, Suzuki Y, Nishikawa T et al. (2004): Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. In: *Nature Genetics* 36, S. 40–45.
94. Ott C, Heinmöller E, Gaumann A et al. (2007): Intraepitheliale Neoplasien (PanIN) und intraduktale papillär-muzinöse Neoplasien (IPMN) des Pankreas als Vorläufer des Pankreaskarzinoms. In: *Medizinische Klinik – Intensivmedizin und Notfallmedizin* 102, S. 127–135.
95. Oyarzabal A, Bravo-Alonso I, Sánchez-Aragó M et al. (2016): Mitochondrial response to the BCKDK-deficiency: Some clues to understand the positive



- dietary response in this form of autism. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1862, S. 592–600.
96. Pagano M, Pepperkok R, Verde F et al. (1992): Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. In: *The EMBO Journal* 11, S. 961–971.
  97. Parsa I, Longnecker DS, Scarpelli DG et al. (1985): Ductal metaplasia of human exocrine pancreas and its association with carcinoma. In: *Cancer Research* 45, S. 1285–1290.
  98. Peinemann F, Danner DJ (1994): Maple syrup urine disease 1954 to 1993. In: *Journal of Inherited Metabolic Disease* 17, S. 3–15.
  99. Petersen GM, De Andrade M, Goggins M et al. (2006): Pancreatic cancer genetic epidemiology (PACGENE) consortium. In: *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 15, S. 704–710.
  100. Poot M (2013): Towards identification of individual etiologies by resolving genomic and biological conundrums in patients with autism spectrum disorders. In: *Molecular Syndromology* 4, S. 213–226.
  101. Popov KM, Zhao Y, Shimomura Y et al. (1992): Branched-chain  $\alpha$ -Ketoacid Dehydrogenase Kinase: Molecular cloning, expression, and sequence similarity with histidine protein kinases. In: *Journal of Biological Chemistry* 267, S. 13127–13130.
  102. Popov KM, Zhao Y, Shimomura Y et al. (1995): Dietary control and tissue specific expression of Branched-Chain  $\alpha$ -Ketoacid Dehydrogenase Kinase. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 316, S. 148–154.
  103. Popov KM, Hawes JW, Harris RA (1997): Mitochondrial  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase kinases: a new family of protein kinases. In: *Advances in Second Messenger Phosphoprotein Research* 31, S. 105–111.
  104. Qiu S, Adema CM, Lane T (2005): A computational study of off-target effects of RNA interference. In: *Nucleic Acids Research* 33, S. 1834–1847.
  105. Raab RM, Stephanopoulos G (2004): Dynamics of gene silencing by RNA interference. In: *Biotechnology and Bioengineering* 88, S. 121–132.

106. Real FX (2003): A “catastrophic hypothesis” for pancreas cancer progression. In: *Gastroenterology* 124, S. 1958–1964.
107. Real FX, Cibrián-Uhalte E, Martinelli P (2008): Pancreatic cancer development and progression: remodeling the model. In: *Gastroenterology* 135, S. 724–728.
108. Redston MS, Caldas C, Seymour AB et al. (1994): p53 mutations in pancreatic carcinoma and evidence of common involvement of homocopolymer tracts in DNA microdeletions. In: *Cancer Research* 54, S. 3025–3033.
109. Rhim AD, Oberstein PE, Thomas DH et al. (2014): Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. In: *Cancer Cell* 25, S. 735–747.
110. Robert-Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2015): Krebs in Deutschland 2011/2012. In: *Gesundheitsberichterstattung des Bundes*, S. 18–25, 50–53.
111. Saxena S, Jónsson ZO, Dutta A (2003): Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. In: *The Journal of Biological Chemistry* 278, S. 44312–44319.
112. Scacheri PC, Rozenblatt-Rosen O, Caplen NJ et al. (2004): Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, S. 1892–1897.
113. Schriever SC, Deutsch MJ, Adamski J et al. (2013): Cellular signaling of amino acids towards mTOR1 activation in impaired human leucine catabolism. In: *Journal of Nutritional Biochemistry* 24, S. 824–831.
114. Schwarte-Waldhoff I, Schmiegel W (2002): Smad4 transcriptional pathways and angiogenesis. In: *International Journal of Gastrointestinal Cancer* 31, S. 47–59.
115. Shimomura Y, Obayashi M, Murakami T et al. (2001): Regulation of branched-chain amino acid catabolism: nutritional and hormonal regulation of activity and expression of the Branched-Chain alpha-Keto acid Dehydrogenase Kinase. In: *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 4, S. 419–423.

116. Shimomura Y, Honda T, Shiraki M et al. (2006): Branched-chain amino acid catabolism in exercise and liver disease. In: *Journal of Nutrition* 136, S. 250S–253S.
117. Sudbery I, Enright AJ, Fraser AG et al. (2010): Systematic analysis of off-target effects in an RNAi screen reveals microRNAs affecting sensitivity to TRAIL-induced apoptosis. In: *BMC Genomics* 11:175.
118. Suehara N, Mizumoto K, Muta T et al. (1997): Telomerase elevation in pancreatic ductal carcinoma compared to nonmalignant pathological states. In: *Clinical Cancer Research* 3, S. 993–998.
119. Suryawan A, Hawes JW, Harris RA et al. (1998): A molecular model of human branched-chain amino acid metabolism. In: *American Journal of Clinical Nutrition* 68, S. 72–81.
120. Sweatt AJ, Wood M, Suryawan A et al. (2004): Branched-chain amino acid catabolism: unique segregation of pathway enzymes in organ systems and peripheral nerves. In: *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism* 286, S. E64–E76.
121. Tada M, Ohashi M, Shiratori Y et al. (1996): Analysis of K-ras gene mutation in hyperplastic duct cells of the pancreas without pancreatic disease. In: *Gastroenterology* 110, S. 227–231.
122. Terhune PG, Phifer DM, Tosteson TD et al. (1998): K-ras mutations in focal proliferative lesions of human pancreas. In: *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 7, S. 515–521.
123. Thayer SP, Di Magliano MP, Heiser PW (2003): Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. In: *Nature* 425, S. 851–856.
124. Toyoshima H, Hunter T (1994): p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. In: *Cell* 78, S. 67–74.
125. Tso SC, Qi X, Gui WJ et al. (2013): Structure-based design and mechanisms of allosteric inhibitors for mitochondrial Branched-Chain  $\alpha$ -Ketoacid Dehydrogenase Kinase. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, S. 9728–9733.

126. Tsutsumi S, Hogan V, Nabi IR et al. (2003): Overexpression of the Autocrine Motility Factor/ Phosphoglucose Isomerase induces transformation and survival of NIH-3T3 fibroblasts. In: *Cancer Research* 63, S. 242–249.
127. Tumorregister München (2014): Basis-Statistiken C25: Bösartige Neubildung des Pankreas. Online verfügbar unter [http://www.tumorregister-muenchen.de/facts/base/base\\_C25\\_\\_G.pdf](http://www.tumorregister-muenchen.de/facts/base/base_C25__G.pdf).
128. Tumorregister München (2014): Überleben C25: Pankreaskarzinom. Online verfügbar unter [http://www.tumorregister-muenchen.de/facts/surv/surv\\_C25\\_\\_G.pdf](http://www.tumorregister-muenchen.de/facts/surv/surv_C25__G.pdf).
129. Ui-Tei K, Naito Y, Takahashi F et al. (2004): Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. In: *Nucleic Acids Research* 32, S. 936–948.
130. Ui-Tei K, Naito Y, Nishi K et al. (2008): Thermodynamic stability and Watson–Crick base pairing in the seed duplex are major determinants of the efficiency of the siRNA-based off-target effect. In: *Nucleic Acids Research* 36, S. 7100–7109.
131. Van Heek NT, Meeker AK, Kern SE et al. (2002): Telomere shortening is nearly universal in pancreatic intraepithelial neoplasia. In: *American Journal of Pathology* 161, S. 1541–1547.
132. Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP et al. (2013): Increased survival in pancreatic cancer with nab-Paclitaxel plus Gemcitabine. In: *New England Journal of Medicine* 369, S. 1691–1703.
133. Vonlaufen A, Joshi S, Qu C et al. (2008): Pancreatic stellate cells: partners in crime with pancreatic cancer cells. In: *Cancer Research* 68, S. 2085–2093.
134. Watanabe H, Takehana K, Date M et al. (1996): Tumor cell Autocrine Motility Factor is the Neuroleukin/ Phosphohexose Isomerase Polypeptide 1. In: *Cancer Research* 56, S. 2960–2963.
135. Wilentz RE, Geradts J, Maynard R et al. (1998): Inactivation of the p16 (INK4A) tumor-suppressor gene in pancreatic duct lesions: loss of intranuclear expression. In: *Cancer Research* 58, S. 4740–4744.
136. Wilentz RE, Iacobuzio-Donahue CA, Argani P et al. (2000): Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inac-

- tivation occurs late in neoplastic progression. In: *Cancer Research* 60, S. 2002–2006.
137. Wynn RM, Kato M, Machius M et al. (2004): Molecular mechanism for regulation of the human mitochondrial Branched-Chain  $\alpha$ -Ketoacid Dehydrogenase Complex by phosphorylation. In: *Structure* 12, S. 2185–2196.
  138. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H et al. (1993): p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. In: *Nature* 366, S. 701–704.
  139. Yamano M, Fujii H, Takagaki T et al. (2000): Genetic progression and divergence in pancreatic carcinoma. In: *American Journal of Pathology* 156, S. 2123–2133.
  140. Zhang L, Sanderson SO, Lloyd RV et al. (2007): Pancreatic intraepithelial neoplasia in heterotopic pancreas: evidence for the progression model of pancreatic ductal adenocarcinoma. In: *American Journal of Surgical Pathology* 31, S. 1191–1195.
  141. Zhao Y, Samal E, Srivastava D (2005): Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. In: *Nature* 436, S. 214–220.
  142. Zhen H, Kitaura Y, Kadota Y et al. (2016): mTORC1 is involved in the regulation of branched-chain amino acid catabolism in mouse heart. In: *Federation of European Biochemical Societies Open Bio* 6, S. 43–49.
  143. Zigler JS Jr, Hodgkinson CA, Wright M et al. (2016): A spontaneous missense mutation in Branched Chain Keto Acid Dehydrogenase Kinase in the rat affects both the central and peripheral nervous systems. In: *Public Library of Science ONE* 11: e0160447.

## 9. Anhang

### 9.1 Weitere Abbildungen

```

1  ggcggtggcctggatgcgcggggcgcccggaacggcacgtcctcagaccaaactacaactcc
61  caggaccagcgggcgctgccgcccacgcgacgtcacggcgggcgaggggcgaggcggt
121  gggcgctggcgagtggactgttcgagcccttccgctgggacccgggcccctggctccggc
181  cccgcgatgggagctgctctccgcgggctgagcctgtcagcatcctcgacgcaccctggc
241  cctgaagtcggagaagagcccctaccacccacaccccccttgccccattttgggtcgcc
301  tgggtcctcagtcctagcggatcctcagtcctagcggccaccgggtctgaaaggagcaag
361  acgatgatcctggcgctcgggtgctgaggagcgggtcccggggggcggttccgctccggccc
421  ctccctgggacccgcactcgcgctccggggcccgctcgacgtcggccaccgacacacaccac
481  gtggagatggctcgggagcgctccaagaccgtcaccctccttttaacaccagtcggccatc
541  gacgcggcgagcggagaagccctcagtcgcgctaacgcccaccatgatgctctacgctggc
601  cgctctcaggacggcagccaccttctgaaaagtgtcggtaacctgcagcaagaacttcca
661  gtgaggattgtcaccgcatcaagggttccgctgccttcctttcatcattggctgcaac
721  cccaccatactgcacgtgcatgagctatataatccgtgccttccagaagctgacagacttc
781  cctccgatcaaggaccaggcggaacgagggccagtaactgcccagctgggtgcagacgtctg
841  gatgaccacaaggatgtggtgacctcttggcagagggcctacgtgagagccggaagcac
901  atagaggatgaaaagctcgtccgctacttcttggacaagacgctgacttcgaaggcttggga
961  atccgcatgttggccacgcatcacctggcgctgcatgaggacaagcctgactttgtcggc
1021 atcatctgtactcgtctctcaccaaagaagattattgagaagtgggtggactttgccaga
1081 cgctgtgtgagcacaagtatggcaatgcgccccgtgtccgcatcaatggccatgtggct
1141 gcccggttccccttcatccctatgccactggactacatcctgccggagctgctcaagaat
1201 gccatgagagccacaatggagagtcaactagacactccctacaatgtcccagatgtggctc
1261 atcaccatcgccaacaatgatgtcgatctgatcatcaggatctcagaccgtgggtggagga
1321 atcgctcacaaagatctggaccgggtcatggactaccacttactactgctgaggccagc
1381 acacaggacccccggatcagccccctctttggccatctggacatgcatagtggcgcccag
1441 tcaggacccatgcacggcttgggttgggttggccacgtcacgggcctacgcggagtac
1501 ctcggtgggtctctgcagctgcagtccttgcagggcattggcacggacgtctacctgagg
1561 ctccgccacatcgatggccgggaggaaaagcttccggatctgacccccacagcctttggcct
1621 gctcaccgcagcagcctgggcccgcattccctgcaggacctcccgggtcaggcagggcggc
1681 cccctgctccacacactgctgcatcttgggtctcagggacccagacagatggacttacat
1741 ggagctgggcaactgcccctgcctcaacagggtccattgcctcctcgctccagaacttggga
1801 gcagggaagtgggcacccctgaggcctccagcaccagttccgtcattctcgttccctgggga
1861 accccactctgacctgttattaaagtccacattttgaatgcctctcggggccccgtgtg
1921 tggggagggcaggtgaacttttgttctgccccattcaggttactgagcccttgggtt
1981 gaactgggtcgtgtcccagtccttadctgccctgagagcctggcaggccaggagtagaa
2041 tgggtcccaagtctgttgcattgtttgatttgggtgggagtgggatgactgcagcaccttat
2101 acaaagagctttcattcatcttgttgaaaaa

```

**Abbildung 22: Bindungsstellen der siRNA 1, 3 und 5 sowie des hBCKDK-Primers in der BCKDK-Isoform 1.**

Dargestellt ist die Basenabfolge der Isoform 1 der BCKDK. Rot markiert ist die Bindungsstelle der siRNA 1, gelb diejenige der siRNA 3 und in blau die Bindungsstelle der siRNA 5. Alle verwendeten siRNAs binden die mRNA der BCKDK-Isoform 1 im codierenden Bereich. Die Bindungsstelle des hBCKDK-Primers, der für die qRT-PCR verwendet wurde, ist in grün dargestellt.

```

1  ggcgtggcctggatgcgcgggcccgggacggcacgtcctcagaccaaactacaactcc
61  caggacccagcgggcgctgccgcccacgcgacgtcacggcggcgaggggcgaggcggct
121  gggcgccctggcgagtggactgttcgagcccttccgctgggacccgggcccctggctccggc
181  cccgcgatgggagctgctctccgcgggctgagcctgtcagcatcctcgacgcaccctggg
241  ccctgaagtcgggagaagagcccctacccacccacaccccccttgccccattttgggtcgcc
301  tgggtcctcagtcctagcggatcctcagtcctagcggccaccgggtctgaaaggagcaag
361  acgatgatcctggcgctcgtgctgaggagcgggtcccggggggcgggcttcgcgtccggccc
421  ctcttgggacccgcactcgcgctccgggcccgcgtcgacgtcggccaccgacacacaccac
481  gtggagatggctcgggagcgtccaagaccgtcacctccttttcaaccagtcggccatc
541  gacgcggcagcgggagaagccctcagtcgcctaacgcccaccatgatgctctacgctggc
601  cgctctcaggacggcagccaccttctgaaaagtgcgtcggtacctgcagcaagaacttcca
661  gtgaggattgctcaccgcatcaagggttccgctgccttctttcatcattgggtgcaac
721  cccaccatactgcacgtgcatgagctatatatccgtgccttccagaagctgacagacttc
781  cctccgatcaaggaccaggcggacgaggcccagtagtgcagctgggtgcgacagctgctg
841  gatgaccacaaggatgtggtgacctcttggcagaggccctacgtgagagccggaagcac
901  atagaggatgaaaagctcgtccgctacttcttggacaagacgctgacttcgaaggcttggg
961  atccgcgatgttggccacgcatcacctggcgctgcatgaggacaagcctgactttgtcggc
1021  atcatctgtactcgtctctcaccaaagaagattattgagaagtgggtggactttgccaga
1081  cgctgtgtgagcacaagtatggcaatgcgccccgtgtccgcatcaatggccatgtggct
1141  gcccggttcccccttcatccctatgccactggactacatcctgccggagctgctcaagaat
1201  gccatgaggatctcagaccgtggtggaggaatcgctcaciaaagatctggaccgggtcatg
1261  gactaccacttcaactactgctgaggccagcacacaggacccccggatcagccccctctt
1321  ggccatctggacatgcatagtggcgcccagtcaggacccatgcacgggtgagacctgcc
1381  aggccaggatggaggggtgggggacccaggagactcaagcctctgaagcctcctgtcct
1441  gtccccctgcccacccccagctttggcttcgggttggccacgtcacgggacctacgggag
1501  tacctcgggtgggtctctgcagctgcagtccttcgagggcattggcacggacgtctacctg
1561  cggctccgccacatcgatggccgggaggaaagcttccggatctgacccacagcctttgg
1621  cctgctcacccgaccagcctgggcccgcattccctgcaggacctcccgggtcaggcagggc
1681  ggccccctgctccacacactgctgcatcttgggtctcagggaccagacagatggactta
1741  catggagctgggcactgccctgcctcaacagggtccattgcctcctgcctccagaactt
1801  ggagcagggaagtgggcaccctgaggcctccagcaccagttccgtcattctcgttccctgg
1861  ggaacccccactctgacctgttattaaagttcacattttgaatgccctctcgggccccgt
1921  gtgtggggagggcagggtgaacttttgtttctgccccattcagggttcaactgagcccttgg
1981  gttgaactgggttcgtgtcccagttcttcttctgcccctgagagcctggcaggccaggagta
2041  gaatgggtcccaagtctgttgcatgtttgatttgggtgggagtgaggatgactgcagcacct
2101  tatacaaagagctttcattcatcttgttgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

**Abbildung 23: Bindungsstellen der siRNA 1 und 5 sowie des hBCKDK-Primers in der BCKDK-Isoform 2.**

Dargestellt ist die Basenabfolge der BCKDK-Isoform 2. Die rote Markierung zeigt die Bindungsstelle der siRNA 1, die blaue die der siRNA 5, die grüne die des hBCKDK-Primers. Die Bindungssequenz der siRNA 3 ist in der Basenabfolge der Isoform 2 nicht vorhanden.

```

1  ggcgtggcctggatgcgcgggcgcccgggacggcacgtcctcagaccaaactacaactcc
61  caggaccagcgggcgctgccgcccacgcgacgtcacggcggcgaggggcgaggcgggt
121  gggcgccctggcgagtggactgttcgagcccttcgctgggaccggggccctggctccggc
181  cccgcgatgggagctgctctccgcgggctgagcctgtcagcatcctcgacgcaccctgggt
241  ccctgaagtcgggagaagagcccctacccacccacaccccccttgccccattttgggtcgcc
301  tgggtcctcagtcctagcggatcctcagtcctagcggccaccgggtctgaaaggagcaag
361  acgatgatcctggcgctcgggtgctgaggagcgggtcccggggcgggcttcgctccggccc
421  ctcttgggacccgcactcgcgctccgggcccgcgtcgacgtcggccaccgacacacaccac
481  gtggagatggctcgggagcgctccaagaccgtcacctccttttcaaccagtcggccatc
541  gacgcggcagcgggagaagccctcagtcgcctaacgcccaccatgatgtctacgctggc
601  cgctctcaggacggcagccaccttctgaaaagtgtcgtacctgcagcaagaacttcca
661  gtgaggattgtccacgcatcaagggttccgctgccttcccttcatcattgggtgcaac
721  cccaccatactgcacgtgcatgagctatatatccgtgccttccagaagctgacagacttc
781  cctccgatcaaggaccaggcggacgaggcccagtagtgcagctgggtgcgacagctgctg
841  gatgaccacaaggatgtggtgacctcttggcagaggccctacgtgagagccggaagcac
901  atagaggatgaaaagctcgtccgctacttcttggacaagacgctgacttcgaggcttggg
961  atccgcgatgttggccacgcatcacctggcgctgcatgaggacaagcctgactttgtcggc
1021  atcatctgtactcgtctctcaccaaagaagattattgagaagtgggtggactttgccaga
1081  cgctgtgtgagcacaagtatggcaatgcgccccgtgtccgcatcaatggccatgtgggt
1141  gcccggttcccccttcatccctatgccactggactacatcctgcccggagctgctcaagaat
1201  gccatgagagccacaatggagagtcaactagacactccctacaatgtcccagatgtgggtc
1261  atcaccatcgccaacaatgatgtcgatctgatcatcaggatctcagaccgtgggtggagga
1321  atcgctcacaaagatctggaccgggtcatggactaccacttcactactgctgaggccagc
1381  acacaggacccccggatcagccccctcttggccatctggacatgcatagtggcgcccag
1441  tcaggacccatgcacgggtgagaccctgccaggccaggatggaggggtgggggaccccag
1501  gagactcaagcctctgaagcctcctgtcctgtccccctgccacccccagctttggcttc
1561  ggggtgcccacgtcacgggcctacgcggagtagctcgtggtggtctctgcagctgcagtc
1621  ctgcagggcattggcacggacgtctacctgcggctccgccacatcgatggccgggaggaa
1681  agcttccgcatctgacccacagccttggcctgctcaccgaccagcctgggcccgcatt
1741  ccctgcaggacctcccgggtcaggcaggggcgccccctgctccacacactgctgcatctt
1801  ggggtctcagggacccagacagatggacttacatggagctgggcactgcctgcctcaaca
1861  ggggtccattgcctcctcgctccagaacttggagcagggaagtgggcacccctgaggcctc
1921  cagcaccagtccgctcattctcgcttccctggggaacccccactctgacctgttattaaagt
1981  tcacattttgaaatgccctctcgggccccgtgtgtggggaggggcagggtgaactttgtttc
2041  tgccccattcaggttccactgagcccttgggttgaactgggttcgtgtcccagctctcttac
2101  ctgccctgagagcctggcaggccaggagtagaatgggtcccaagtctgttgcatgtttga
2161  tttggtgggagtggtgatgactgcagcaccttatataaaagagctttcattcatctgttga
2221  aaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

#### Abbildung 24: Bindungsstellen der siRNA 1, 3 und 5 sowie des hBCKDK-Primers in der BCKDK-Isoform 3.

Dargestellt ist die Basenabfolge der BCKDK-Isoform 3. Die Bindungsstellen der siRNA und des Primers sind in rot (siRNA 1), gelb (siRNA 3), blau (siRNA 5) und grün (hBCKDK-Primer) dargestellt.

```

1  MILASVLRSG PGGGLPLRPL LGPALALRAR STSATDTHHV EMARERSKT V TSFYNQSAID
61  AAAEKPSVRL TPTMMLYAGR SQDGSHLLKS ARYLQQELPV RIAHRIKGFR CLPFIIGCNP
121  TILHVHELYI RAFQKLTDFP PIKDQADEAQ YCQLVRQLLD DHKDVVTLLA EGLRESRKHI
181  EDEKLVRVFL DKTLTSRLGI RMLATHHLAL HEDKPDFVGI ICTRLSPKKI IEKWVDFARR
241  LCEHKYGNAP RVRINGHVAA RFPFIPMLD YILPELLKNA MRATMESHLD TPYNVPDVVI
301  TIANNDVDLI IRISDRGGGI AHKDLDRVMD YHFTTAEAST QDPRISPLFG HLDMHSGAQS
361  GPMHGFQFGL PTSRAYAEYL GGSLQLQSLQ GIGTDVYLRL RHIDGREESF RI

```

#### Abbildung 25: Immunogenesequenz des BCKDK-Antikörpers.

Dargestellt ist die Aminosäuresequenz, die der verwendete BCKDK-Antikörper bindet. Die grau hinterlegten Bereiche fehlen in den BCKDK-Isoformen 2 und 3, wodurch der BCKDK-Antikörper diese Isoformen nicht binden kann.



## 9.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren Damen/ Herren in Marburg:

Apitzsch, Bartsch, Baumann, Becker, Bertelmann, Brundin, Cetin, Czubayko, Damanakis, Daut, Dettmeyer, Dodel, El-Zayat, Fendrich, Feuser, Franke, Fritz, Geks, Görg, Görg, Gress, Hofmann, Hoyer, Jerrentrup, Kann, Kill, Kircher, Köhler, König, Koolmann, Kortus-Götze, Kühne, Kühnert, Kusch, Lill, Lohoff, Maier, Meissner, Metzelder, Moll, Moosdorf, Mronga, Mueller, Neff, Neubauer, Neumüller, Oberwinkler, Oertel, Oliver, Pagenstecher, Pape-Meyer, Pfestroff, Pfützner, Reese, Renz, Rexin, Rothmund, Ruchholtz, Schäfer, Schäfer, Sekundo, Sevinc, Schneider, Schütz, Steinfeldt, Stiewe, Thiem, Vogelmeier, Vogt, Wagner, Werner, Westermann, Wiegand, Wilhelm, Wrocklage, Wulf, Zaraca, Zemlin, Zwiorek

### 9.3 Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Thomas Gress für die Möglichkeit danken, diese Dissertation in der Inneren Medizin, Abteilung Gastroenterologie, anzufertigen.

Ich danke meinem Doktorvater, Prof. Dr. Malte Buchholz, für das Schaffen eines angenehmen Arbeitsklimas, für gute Ratschläge und konstruktive Kritik. Zudem danke ich ihm für das zuverlässige Beantworten meiner Anfragen und das stets zeitnahe Durchsehen der Rohfassungen.

Der Arbeitsgruppe um Malte Buchholz danke ich für die nette Gesellschaft. Besonders danken möchte ich dabei Ramona Diels, Harald Schmidt und Melanie Sauer, die mir stets mit sehr viel Rat, sehr viel Tat und immer unterhaltsamen Anekdoten zur Seite gestanden haben. Auch Daniela Reichelt, Anja Krattenmacher, Lisa Ort-müller und Christin Häuser danke ich nicht zuletzt für amüsante Abende weit weg vom Laboralltag, die den nächsten Morgen im Labor doch sehr viel erträglicher machten.

Ein großer Dank geht an meine Familie sowie Freunde, die diverse Hoch- und Tief-flüge mit mir durchlebt haben. Besonders meine Familie – inklusive Ilse – bewun-dere ich dafür, dass sie den Dokortitel trotz Unmengen toter Zellen immer für möglich hielten. Miri und Feli, geteiltes Leid ist halbes Leid – danke für die Unter-stützung, die ihr mir habt zukommen lassen – und den Wein nach Feierabend, den Vivi durch ihr immer verkündetes Beileid versüßt hat. Marc danke ich für das bio-chemische Wissen, das er mir eingeflößt hat. Fabi, danke für das Freihalten eines Platzes direkt neben dir in der Bibliothek und die interessanten – thematisch von der Doktorarbeit abweichenden – Diskussionen in der ausgedehnten Mittagspause.

Besonders hervorheben möchte ich natürlich meinen großen Bruder, der mir erst durch seine gut gemeinten Ratschläge zu dieser Erfahrung verholfen hat. Als Be-strafung hierfür durfte er Tage und Nächte damit verbringen, das (noch nicht ganz) endgültige Werk in verschiedensten Versionen zu lesen und zu kommentieren. Oh-ne dich wäre das Ganze nur halb so lustig und vermutlich fast unmöglich gewesen!